



UNIVERSITAS INDONESIA

**ANALISIS PENGARUH INTERAKSI DOSIS PAJANAN
KUMULATIF, PON-1, AChE, TCPy, VARIASI GENETIK
CYP2B6 DAN CYP2C19 TERHADAP DISRUPSI TIROID
PADA PENYEMPROT PESTISIDA DENGAN
PAJANAN UTAMA KLORPIRIFOS**

DISERTASI

**LIEM JEN FUK
1806274096**

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA
JAKARTA
OKTOBER 2021**



UNIVERSITAS INDONESIA

**ANALISIS PENGARUH INTERAKSI DOSIS PAJANAN
KUMULATIF, PON-1, AChE, TCPy, VARIASI GENETIK
CYP2B6 DAN CYP2C19 TERHADAP DISRUPSI TIROID
PADA PENYEMPROT PESTISIDA DENGAN
PAJANAN UTAMA KLORPIRIFOS**

DISERTASI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Doktor dalam bidang
Ilmu Kedokteran pada Universitas Indonesia di Jakarta di bawah pimpinan
Rektor Universitas Indonesia Prof. Ari Kuncoro, S.E., MA, PhD
Untuk dipertahankan di hadapan Dewan Penguji
Pada hari Selasa tanggal 5 Oktober 2021 pukul 10.00 WIB

**LIEM JEN FUK
1806274096**

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS INDONESIA
JAKARTA
OKTOBER 2021**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Disertasi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Liem Jen Fuk

NPM : 1806274096

Tanda Tangan :

Tanggal : 5 Oktober 2021

HALAMAN PENGESAHAN

Disertasi ini diajukan oleh :

Nama : Liem Jen Fuk

NPM : 1806274096

Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran

Judul Disertasi : Analisis Pengaruh Interaksi Dosis Paparan Kumulatif, PON-1, AChE, TCPy, Variasi Genetik CYP2B6 dan CYP2C19 terhadap Disrupsi Tiroid pada Penyemprot Pestisida dengan Paparan Utama Klorpirifos

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Doktor pada Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Promotor : Prof. dr. Muchtaruddin Mansyur, MS, Sp.Ok, PhD (.....)

Kopromotor : Prof. Dr. dr. Imam Subekti, Sp.PD-KEMD (.....)

: Dr. dr. Dewi S. Soemarko, MS, Sp.Ok (.....)

Tim Penguji :

Prof. Dr. dr. Suhendro, Sp.PD-KPTI (Ketua) (.....)

Prof. dr. Franciscus D. Suyatna, PhD, Sp.FK (Anggota) (.....)

Dr. dra. Dwi Anita Suryandari, M.Biomed. (Anggota) (.....)

Dr. dr. Aria Kekalih, M.T.I. (Anggota) (.....)

drh. Safarina G. Malik, MSc, PhD (Anggota) (.....)

Dr. Bertha Pangaribuan, M.Si. (Anggota) (.....)

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 5 Oktober 2021

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Kuasa karena atas kasih karunia dan penyertaan-Nya saya dapat menyelesaikan Program S3 Ilmu Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Pada kesempatan yang baik ini, izinkan saya menyampaikan terima kasih kepada Rektor Universitas Indonesia, **Prof. Ari Kuncoro, S.E., MA, PhD**, Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, **Prof. Dr. dr. Ari Fahrial Syam, Sp.PD-KGEH, MMB** beserta seluruh jajarannya atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk menjalani Program S3 Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Kepada Yth. **Prof. Dr. dr. Suhendro, Sp.PD-KPTI**, Ketua Program Studi S3 Ilmu Kedokteran FKUI dan **Prof. dr. Harrina Erlianti Rahardjo, Sp.U(K), PhD**, Sekretaris Program Studi S3 Ilmu Kedokteran FKUI, saya mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya atas segala bimbingan dan motivasi yang diberikan selama saya menjalani pendidikan. Kepada Yth. **Prof. Dr. dr. Sarwono Waspadji, Sp.PD-KEMD** dan **Prof. dr. Saleha Sungkar, DAP&E, MS, Sp.ParK**, saya bersyukur berkesempatan memperoleh bimbingan, saran dan arahan Prof. Sarwono dan Prof. Saleha yang dengan sabar dan teliti menelaah lembar demi lembar naskah disertasi ini. Terima kasih sebesar-besarnya untuk motivasi dan waktu yang telah didedikasikan.

Kepada Yth. Komisaris Utama Prodia Occupational Health Institute International, **Bapak Andi Wijaya, PhD**, teladan yang Bapak berikan bagi setiap insan di Prodia telah memotivasi saya menjalani hari-hari dengan penuh semangat untuk menjadi lebih baik setiap waktu. Terima kasih yang tak terhingga untuk dukungan penuh yang Bapak berikan bagi saya dalam menjalani studi S3. Semoga Tuhan membalas kebaikan Bapak berlimpah-limpah. Terima kasih setinggi-tingginya saya sampaikan kepada Yth. Direktur Prodia Utama **Ibu Dra. Endang Hoyaranda** atas Beasiswa Pendidikan yang diberikan melalui Prodia Utama. Sungguh saya sangat bersyukur atas karunia ini dan senyatanya apa yang saya terima membuat saya dapat menyelesaikan penelitian dan studi S3 ini. Terima kasih Bu, hanya Tuhan yang dapat membalas budi baik yang Ibu bagikan.

Kepada Yth. Plt. Kepala Dinas Kesehatan Kabupaten Karanganyar **Ibu Purwati S.K.M, M.Kes.**, Kepala Bidang Sumber Daya Kesehatan Dinas Kesehatan Kabupaten Karanganyar **dr. Arif Setyoko, M.M.**, dan Dinas Penanaman Modal dan Pelayanan Terpadu Satu Pintu Kabupaten Magelang saya ucapkan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya atas dukungan yang diberikan sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan baik.

Kepada Yth. **Prof. dr. Muchtaruddin Mansyur, MS, Sp.Ok, PhD**, terima kasih saya ucapkan atas kesediaan Prof. Muchtar menerima saya dan menjadi Promotor dalam studi Doktor yang saya jalani. Saya bersyukur karena dalam situasi yang tidak menentu, Prof. Muchtar dengan penuh keyakinan mendorong saya untuk terus maju menjalani tahapan-tahapan penelitian seperti yang telah direncanakan. Sejak awal saya tidak pernah merasa sendirian dan senantiasa dimampukan untuk bergerak maju menyelesaikan studi S3 ini karena Prof. Muchtar selalu hadir dan memberikan solusi atas kesulitan yang saya hadapi dalam studi. Terima kasih Prof. Muchtar atas besarnya perhatian, komitmen, dan kepercayaan yang diberikan kepada saya sejak awal hingga akhir studi saya. Kepada Yth. **Prof. Dr. dr. Imam Subekti, Sp.PD-KEMD**, yang berkenan menjadi kopromotor saya, terima kasih saya ucapkan untuk kesabarannya membimbing, memberikan arahan dan menyediakan kesempatan berdiskusi bagi saya. Setiap waktu yang Prof. Imam luangkan dalam diskusi senantiasa memberikan ide, solusi dan membuka cakrawala berpikir baru bagi saya untuk menjawab kesulitan-kesulitan yang saya hadapi dalam penelitian. Ucapan terima kasih yang setinggi-tingginya saya sampaikan kepada Yth. **Dr. dr. Dewi S. Soemarko, MS, Sp.Ok.** atas kesediaannya menjadi kopromotor saya. Diskusi dengan Dr. Dewi adalah sebuah momen yang sangat berharga karena saya selalu memperoleh semangat, tenaga, dan motivasi tambahan untuk mampu menjalani tahap-tahap selanjutnya. Saya mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada Yth. **Prof. dr. Franciscus D. Suyatna, PhD, Sp.FK**, atas dedikasi dan kesabarannya membimbing dan memberikan pengajaran bagi saya. Terima kasih Prof. Frans telah demikian telaten memeriksa persiapan pengajuan etik penelitian ini serta memberi masukan yang sangat berharga dalam penulisan disertasi ini. Saya menyampaikan ucapan terima kasih sebesar-besarnya kepada Yth. **Dr. dra. Dwi Anita**

Suryandari, M.Biomed., atas kesabaran dan kelembutan hati Ibu Anita selama menjadi pembimbing dan penguji saya. Terima kasih atas kesediaan Ibu memberikan masukan, saran, dan arahan dalam penulisan pembahasan dalam disertasi ini khususnya sehubungan dengan polimorfisme genetik. Terima kasih yang tulus saya haturkan kepada Yth, **Dr. dr. Aria Kekalih, M.T.I.**, yang berkenan menjadi pembimbing dan penguji mengenai metodologi penelitian, pengolahan data dan statistik sehingga saya dapat mengolah data penelitian ini dengan baik. Terima kasih Dr. Aria untuk setiap masukan dan solusi yang diberikan di setiap permasalahan yang muncul dalam proses penulisan hasil disertasi ini. Terima kasih saya haturkan kepada Yth. **drh. Safarina G. Malik, MSc, PhD**, atas ketulusannya dalam membimbing saya sejak awal penulisan proposal penelitian hingga selesainya disertasi ini khususnya terkait dengan polimorfisme genetik. Saya bersyukur berkesempatan memperoleh pengajaran dari Ibu Ina yang dalam setiap kesibukannya masih berkenan memeriksa dengan detail dan memberi masukan atas disertasi ini. Saya mengucapkan terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada Yth. **Dr. Bertha Pangaribuan, M.Si.**, yang di tengah kesibukan yang sangat padat masih berkenan menjadi pembimbing dan penguji saya dari Prodia Occupational Health Institute International. Terima kasih untuk setiap masukan yang sangat berharga yang menjadikan hasil penelitian ini lebih baik lagi. Saya juga ingin mengucapkan terima kasih kepada Ibu Bertha untuk setiap kesempatan, kepercayaan, kelonggaran waktu dan keleluasaan mengatur waktu kerja selama saya melaksanakan pendidikan S3 ini. Terima kasih dan salam hormat saya untuk Prof./ Bapak Ibu Doktor segenap tim pembimbing dan penguji, semoga Tuhan Yang Maha Kuasa membalas segala budi dan perbuatan baik yang diberikan dengan berkat melimpah.

Yang saya hormati, guru saya almarhum **dr. Sudadi Hirawan, MS, Sp.Ok**, terima kasih telah menjadi sosok yang positif dan inspiratif bagi saya, dan terutama mendorong dan meyakinkan saya untuk mengikuti pendidikan S3 ini. Kepada seluruh Dosen yang telah mengajar dalam pendidikan S3 yang saya jalani yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, terucap terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya atas setiap ilmu, pengetahuan, dan nasihat yang diberikan.

Kepada Yth. **Prodia OHC Cikarang** dan *Prodia Industrial Toxicology Lab* Ibu apt. **Wahyu Purwita Sari S.Farm., M.Farm., Dr. Mulyana, M.Kes., Indah, Dewi Arani, Nadhira; Specialty & Research Lab Head - Laboratorium Klinik Prodia Dr. Miswar Fattah, M.Si., Research Support Intan W. Masfufa MSc dan Bena Zaira S.Si.; Prodia Central Java Region, Laboratorium Klinik Prodia Solo dan Prodia Magelang** Ibu apt. **Maria Diah Fibriani, M.Kes., Ibu apt. R. Beppy Hamuaty, M.Kes., Ibu Ida Yosefa, Bapak Dony Munarko, Ibu Agnes Anggraeni, Novi Hastuti, Agung, Ratna, Bella, Mas Dudik** dan rekan-rekan di Prodia OHI dan Laboratorium Klinik Prodia yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, saya mengucapkan terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya atas dukungan yang diberikan dalam pelaksanaan di lapangan, pengelolaan spesimen, hingga pemeriksaan terhadap spesimen penelitian ini. Kepada Yth. **Pak Bejo Supriyanto dan Pak Fatkhul Hakim**, terima kasih telah turut mencurahkan waktu, tenaga dan perhatian demi berlangsungnya penelitian ini. Hari demi hari yang saya jalani bersama Bapak memberikan saya pemahaman baru tentang kehidupan petani. Terima kasih yang tak terhingga untuk Yth. **setiap petani** yang dengan tulus berpartisipasi dalam penelitian sehingga memungkinkan terselesaikannya disertasi ini.

Kepada Yth. **Pak Pannov, Pak Yana, Pak Aep, Pak Okky, Pak Agung dan segenap tim sekretariat Prodi S3 Ilmu Kedokteran**. Terima kasih telah menjadi mitra yang luar biasa. Saya merasakan sambutan hangat dan ketulusan dari tim yang luar biasa ini dalam menyediakan waktu dan tenaga untuk memudahkan, melancarkan, mendukung setiap proses pembelajaran di Prodi S3 Ilmu Kedokteran. Terima kasih yang sebesar-besarnya kepada **Bu Putri** dan segenap tim perpustakaan UI yang dengan sigap selalu membantu memberikan referensi atau literatur yang dibutuhkan.

Rekan-rekan **Oh4n4-S3 FKUI 2019**, terima kasih tak terhingga untuk kerjasama dan dukungan yang diberikan sejak awal masa studi hingga saat ini. Terima kasih untuk atmosfer positif yang selalu rekan-rekan hadirkan yang tentunya memberikan semangat bagi setiap anggota di dalamnya.

Saya juga ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Yth. Dekan FKIK UKRIDA **dr. Antonius Ritchi Castilani, M.Si., DFM**, Kepala Departemen K3 FKIK UKRIDA **dr. Susanty Winata, M.K.K.** dan seluruh rekan di Departemen K3 FKIK UKRIDA untuk kesempatan berkarya dalam pengajaran di FKIK UKRIDA dan setiap dukungan, doa dan semangat yang diberikan kepada saya selama menjalani proses pendidikan ini.

Rekan-rekan di **Departemen OHBD Prodia OHI**, izinkan saya menyampaikan ucapan terima kasih untuk setiap dukungan yang rekan-rekan berikan selama saya menjalani studi S3, khususnya **Marissa Apriyeni** yang membantu pengurusan dokumen administrasi kerjasama penelitian ini dan **Brilliantika Resy** yang terlibat dalam persiapan kegiatan sidang terbuka.

Teristimewa kepada keluargaku tercinta,

Terima kasih untuk almarhum papa **Agustinus Liem San Boen**, yang tentu selalu menjadi pendoa bagi anak-anaknya di dunia ini. Pa, *here I am, and I won't stop learning like you always taught me.* Terima kasih mama **Swan** tersayang yang tidak pernah berhenti mencurahkan cinta, doa dan memberikan restunya. *Dearest sisters* Liem Tjen Tju, Liem Cen Cing, Dian Sari Dewi Lima, Dewi Oktavia Lima terima kasih untuk setiap doa dan dukungan yang kalian curahkan bagi saya selama menyelesaikan pendidikan S3 ini.

My beloved wife and soulmate, dr. Fanny Rustandi, M.Biomed. (AAM), my dear daughters Clarice Annabelle Liem dan Francine Letticia Liem yang tidak pernah berhenti mendoakan *Daddy* untuk segera menyelesaikan studinya. Terima kasih untuk dukungan, pengertian dan pengorbanan kalian.

Kepada semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, yang telah membantu dan mendukung dalam setiap tahap pendidikan dan penelitian yang saya jalani, saya ucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya. Hanya Tuhan yang dapat membalas semua budi baik Anda sekalian.

Jakarta, 5 Oktober 2021

Liem Jen Fuk

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS
AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Liem Jen Fuk
NPM : 1806274096
Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran
Fakultas : Kedokteran
Jenis karya : Disertasi

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

“Analisis Pengaruh Interaksi Dosis Paparan Kumulatif, PON-1, AChE, TCPy, Variasi Genetik CYP2B6 dan CYP2C19 terhadap Disrupsi Tiroid pada Penyemprot Pestisida dengan Paparan Utama Klorpirifos”

Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta
Pada tanggal : 5 Oktober 2021
Yang menyatakan

Liem Jen Fuk

ABSTRAK

Nama : Liem Jen Fuk
Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran
Judul : Analisis Pengaruh Interaksi Dosis Paparan Kumulatif, PON-1, AChE, TCPy, Variasi Genetik CYP2B6 dan CYP2C19 terhadap Disrupsi Tiroid pada Penyemprot Pestisida dengan Paparan Utama Klorpirifos

Klorpirifos (CPF) adalah insektisida yang paling sering digunakan di sektor pertanian informal dan pajanannya berpotensi mengganggu fungsi tiroid. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis interaksi PON-1, AChE, dan TCPy sebagai markah paparan CPF, polimorfisme CYP2B6 dan CYP2C19 sebagai markah kerentanan, serta TSH, FT4 dan rasio tiroglobulin/FT4 (Tg/FT4) sebagai markah efek disrupsi tiroid akibat paparan CPF.

Penelitian dilakukan dengan desain potong lintang, pada bulan Juli–Oktober 2020. Subjek penelitian adalah 151 petani bawang putih dan sayuran yang menggunakan CPF minimal 1 tahun di Dusun Pancot dan Desa Adipuro, Jawa Tengah. Data karakteristik subjek dan estimasi dosis paparan kumulatif (DPK) diambil dengan wawancara menggunakan kuesioner. Penelitian ini memeriksa PON-1 dan AChE dengan metode fotometri, TCPy urin dengan *liquid chromatography* (LC-MS-MS), hormon tiroid dengan metode ECLIA. Analisis CYP2C19*2 dan *3 dengan PCR-RFLP, CYP2B6*6 dengan TaqMan (rs3745274) dan metode sekuensing Sanger (rs2279343). Data dianalisis menggunakan uji Mann-Whitney U, Kruskal Wallis, regresi linier ganda dan analisis jalur.

Didapatkan proporsi tinggi subjek penelitian yang menggunakan pestisida gabungan dengan kekerapan kontak langsung, frekuensi penggunaan APD yang rendah, volume besar pestisida yang disemprotkan dan luasnya lahan olahan. Frekuensi genotip CYP2B6 adalah *1/*1 (32%); *1/*6 (50%); dan *6/*6 (18%), sedangkan frekuensi genotip CYP2C19 *1/*1, *1/*3, *1/*2, dan *2/*2 berturut-turut adalah 64%, 7%, 23% dan 6%. Kadar TCPy berhubungan positif dengan DPK ($p = 0,012$) sedangkan AChE berhubungan negatif dengan DPK ($p < 0,001$). Variasi genetik CYP2B6*6 berhubungan dengan TCPy yang lebih rendah dibanding *wild-type* ($p = 0,005$). Kelompok DPK tinggi memiliki kadar TSH lebih tinggi ($p = 0,001$) dan rasio Tg/FT4 lebih besar ($p = 0,003$) dibandingkan kelompok DPK rendah. Dalam model analisis jalur, DPK memberikan efek langsung dengan koefisien jalur 0,21 terhadap rasio Tg/FT4 dan efek total 0,28 terhadap TSH. Rasio Tg/FT4 memberikan efek 0,49 terhadap TSH. Kontribusi DPK dan rasio Tg/FT4 terhadap TSH subjek adalah 30,7%.

Disimpulkan konsentrasi TSH pada penyemprot pestisida dengan paparan utama CPF dipengaruhi oleh interaksi variasi genetik CYP2B6*6, TCPy, aktivitas AChE, DPK dan rasio Tg/FT4, menunjukkan hubungan dosis-respons dalam terjadinya disrupsi tiroid.

Kata kunci: disrupsi tiroid, kerentanan genetik, paparan kumulatif CPF, petani, TCPy

ABSTRACT

Name : Liem Jen Fuk
Study Program : Doctoral Program in Medical Science
Title : Analysis of the Interaction Effect of Cumulative Exposure Level, PON-1, AChE, TCPy, CYP2B6 and CYP2C19 Genetic Variations on Thyroid Disruption in Pesticide Sprayers with Primary Exposure to Chlorpyrifos

Chlorpyrifos (CPF) is the most frequently used insecticide in the informal agricultural sector and may interfere with thyroid function. Thus, this study was conducted to determine the interaction of PON-1, AChE, and TCPy as biomarkers of exposure, CYP2B6 and CYP2C19 polymorphisms as biomarkers of susceptibility, and the TSH, FT4 and thyroglobulin/FT4 (Tg/FT4) ratio as biomarkers of effects of thyroid disorders due to CPF exposure.

This cross-sectional study was conducted in July–October 2020. A total of 151 garlic and vegetable farmers who used CPF for at least 1 year in Pancot and Adipuro village, Central Java participated in this study. The data on the characteristics of the subjects and the estimation of cumulative exposure level (CEL) were taken by interview. PON-1 and AChE were analyzed by photometric method, urinary TCPy was detected by liquid chromatography (LC-MS-MS), thyroid parameters were analyzed using ECLIA method, CYP2C19*2 and *3 was analyzed by PCR-RFLP, while CYP2B6*6 was analyzed by TaqMan for rs3745274 and the Sanger sequencing method for rs2279343. Mann-Whitney U, Kruskal Wallis, multiple linear regression and path analysis were performed to analyze the data.

The study found a high proportion of multiple pesticides used and frequent direct contact with pesticides, low frequency of PPE used accompanied by a high volume of mixture applied and broader acres of land. The CYP2B6 genotype frequencies were *1/*1 (32%); *1/*6 (50%); dan *6/*6 (18%), while for CYP2C19 *1/*1, *1/*3, *1/*2, dan *2/*2 were 64%, 7%, 23% and 6 % respectively. TCPy was positively associated with CEL ($p = 0.012$), while AChE activity ($p < 0.001$) was negatively associated with CEL. CYP2B6*6 variant was associated with lower TCPy levels compared to the wild-type ($p = 0.005$). The high CEL group had higher TSH levels ($p = 0.001$) and a higher Tg/FT4 ratio ($p = 0.003$) than the low CEL group. In the path analysis model, CEL has a direct effect with a path coefficient of 0.21 on the ratio of Tg/FT4 and a total effect of 0,28 on TSH. The Tg/FT4 ratio has a direct effect of 0,49 to TSH. The contribution of CEL and Tg/FT4 ratio to the subject' TSH was 30,7%.

Conclusion: The TSH concentrations among pesticide sprayers with primary exposure to CPF was influenced by the interaction of CYP2B6*6 genetic variation, TCPy, AChE activity, CEL and Tg/FT4 ratio, indicating a dose-response relationship in the occurrence of thyroid disruption.

Keywords: cumulative exposure of chlorpyrifos, farmers, genetic susceptibility, TCPy, thyroid disruption

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vii
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	xiii
ABSTRAK	xv
ABSTRACT	xvi
DAFTAR ISI	xvii
DAFTAR TABEL	xx
DAFTAR GAMBAR	xxii
DAFTAR LAMPIRAN	xxiii
DAFTAR SINGKATAN	xxiv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Identifikasi Masalah	2
1.3 Pertanyaan Penelitian	3
1.4 Hipotesis Penelitian	3
1.5 Tujuan Penelitian	4
1.5.1 Tujuan Umum	4
1.5.2 Tujuan Khusus	4
1.6 Manfaat Penelitian	4
1.6.1 Bagi Ilmu Pengetahuan	4
1.6.2 Bagi Masyarakat	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Insektisida Klorpirifos	5
2.1.1 Klasifikasi Pestisida	5
2.1.2 Profil Toksikologi Klorpirifos	5
2.1.3 Monitoring Biologis Paparan Klorpirifos	8
2.2 Polimorfisme Genetik CYP2B6 dan CYP2C19	11
2.3 Dosis Paparan Kumulatif	16
2.4 Kelenjar Tiroid	18
2.4.1 Anatomi & Fungsi Fisiologis Tiroid	18
2.4.2 Sintesis Hormon Tiroid	19
2.4.3 Hipotiroid	21
2.5 Hubungan Paparan CPF, Polimorfisme Genetik, PON-1, Tiroglobulin dan Hormon Tiroid	23
2.6 Lokasi Penelitian	25
2.6.1 Dusun Pancot	25
2.6.2 Desa Adipuro	26
2.7 Profil Petani Bawang	27
2.8 Kerangka Teori	30
2.9 Kerangka Konsep	32

BAB 3 METODE PENELITIAN	35
3.1 Desain, Tempat dan Waktu Penelitian	35
3.2 Populasi, Kriteria Sampel dan Besar Sampel Penelitian	35
3.2.1 Populasi Penelitian	35
3.2.2 Kriteria Inklusi dan Eksklusi	35
3.2.3 Besar Sampel	36
3.3 Cara Kerja Penelitian.....	37
3.4 Alur Penelitian.....	43
3.5 Identifikasi variabel	43
3.5.1 Variabel Terikat.....	43
3.5.2 Variabel Bebas.....	43
3.6 Pengolahan dan Analisis Data	44
3.7 Definisi Operasional	46
3.8 Etika Penelitian.....	48
BAB 4 HASIL PENELITIAN	51
4.1 Alur Rekrutmen Subjek Penelitian	51
4.2 Karakteristik Subjek Penelitian	52
4.2.1 Karakteristik Umum	52
4.2.2 Karakteristik Kegiatan Terpajan Pestisida	52
4.2.3 Variasi Genetik Subjek Penelitian	59
4.3 Pemeriksaan Markah Pajanan Klorpirifos: PON-1, AChE dan TCPy	60
4.3.1 Hubungan Kegiatan Terpajan Pestisida terhadap Markah Pajanan.....	60
4.3.2 Hubungan Variasi Genetik CYP2B6, CYP2C19 dan Kegiatan Terpajan Pestisida terhadap Kadar TCPy	63
4.4 Pemeriksaan Tiroid pada Penyemprot Pestisida Klorpirifos	65
4.5 Interaksi Dosis Pajanan Kumulatif Klorpirifos, Markah Kerentanan, Markah Pajanan dan Efeknya terhadap Tiroid	69
BAB 5 PEMBAHASAN	73
5.1 Karakteristik Pajanan Kumulatif Populasi Penelitian	73
5.1.1 Estimasi Dosis Pajanan Kumulatif	73
5.1.2 Upaya Perlindungan terhadap Pajanan	74
5.1.3 Karakteristik Penggunaan Pestisida.....	76
5.2 Markah Pajanan Klorpirifos	77
5.2.1 Efek Kegiatan Terpajan Pestisida terhadap PON-1.....	77
5.2.2 Efek Kegiatan Terpajan Pestisida terhadap AChE	78
5.2.3 Efek Variasi Genetik CYP2B6 dan CYP2C19 terhadap TCPy.....	79
5.2.4 Efek Kegiatan Terpajan Pestisida terhadap TCPy.....	82
5.3 Markah Efek Pajanan pada Tiroid Penyemprot Pestisida Klorpirifos.....	83
5.3.1 Faktor yang Berkontribusi terhadap TSH.....	83
5.3.2 Disrupsi Tiroid.....	86
5.3.3 Interaksi Faktor yang Berkontribusi terhadap Disrupsi Tiroid.....	88
5.4 Implikasi Hasil Penelitian.....	90
5.5 Keterbatasan dan Kekuatan Penelitian	92
BAB 6 SIMPULAN DAN SARAN	95
6.1 Simpulan.....	95

6.2	Saran.....	95
6.2.1	Untuk Praktik Pertanian	95
6.2.2	Untuk Penyusunan Kebijakan	96
6.2.3	Untuk Profesi Kedokteran Okupasi.....	96
6.2.4	Untuk Penelitian.....	97
	RINGKASAN	99
	SUMMARY.....	111
	DAFTAR PUSTAKA	121
	LAMPIRAN.....	133
	RIWAYAT HIDUP	Error! Bookmark not defined.

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Efek Fungsional Varian CYP2B6 dan CYP2C19	13
Tabel 2.2. Frekuensi Alel Minor Gen CYP2B6*4, *9, dan Frekuensi Genotip CYP2B6*6 pada Berbagai Populasi	15
Tabel 2.3. Frekuensi Alel Minor dan Frekuensi Genotip Gen CYP2C19*2 dan *3 pada Berbagai Populasi	15
Tabel 4.1. Karakteristik Sosiodemografi, Kebiasaan dan Keadaan Fisik Umum..	53
Tabel 4.2. Karakteristik Kegiatan Terpajan Pestisida Berdasarkan Dosis Pajanan Kumulatif	54
Tabel 4.3. Karakteristik Kebiasaan Penggunaan APD	55
Tabel 4.4. Proporsi Penggunaan Pestisida Pertanian Selain Klorpirifos	56
Tabel 4.5. Distribusi Frekuensi Penggunaan Pestisida Gabungan	57
Tabel 4.6. Karakteristik Kebiasaan Selama Bekerja	58
Tabel 4.7. Analisis Regresi Linier Ganda antara Variabel yang Berkontribusi terhadap Dosis Pajanan Kumulatif	58
Tabel 4.8. Distribusi Genotip CYP2B6 dan CYP2C19 Berdasarkan Jenis Kelamin.....	59
Tabel 4.9. Distribusi Genotip CYP2B6 & CYP2C19 Berdasarkan Dosis Pajanan Kumulatif	59
Tabel 4.10. Profil Markah Pajanan Klorpirifos	60
Tabel 4.11. Profil Markah Pajanan Klorpirifos Berdasarkan Karakteristik Individu.....	61
Tabel 4.12. Profil Markah Pajanan Klorpirifos Berdasarkan Karakteristik Kegiatan Terpajan Pestisida	62
Tabel 4.13. Analisis Regresi Linier Sederhana antara Variabel yang Berkontribusi terhadap AChE.....	63
Tabel 4.14. Analisis Regresi Linier Ganda antara Variabel yang Berkontribusi terhadap AChE.....	63
Tabel 4.15. Kadar TCPy Berdasarkan Variasi Genetik Subjek Penelitian.....	64
Tabel 4.16. Analisis Regresi Linier Sederhana antara Variabel yang Berkontribusi terhadap TCPy	64
Tabel 4.17. Analisis Regresi Linier Ganda antara Variabel yang Berkontribusi terhadap TCPy	64
Tabel 4.18. Profil Parameter Pemeriksaan Tiroid	65
Tabel 4.19. Distribusi Frekuensi Abnormalitas TSH, FT4, Tiroglobulin, dan Median Rasio Tg/FT4 Berdasarkan Dosis Pajanan Kumulatif	66

Tabel 4.20. Profil Parameter Pemeriksaan Tiroid Berdasarkan Karakteristik Individu	66
Tabel 4.21. Profil Parameter Pemeriksaan Tiroid Berdasarkan Karakteristik Kegiatan Terpajan Pestisida	67
Tabel 4.22. Analisis Regresi Linier Sederhana antara Variabel yang Berkontribusi terhadap TSH.....	68
Tabel 4.23. Analisis Regresi Linier Ganda antara Variabel yang Berkontribusi terhadap TSH.....	69

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Bioaktivasi dan Detoksifikasi Klorpirifos	7
Gambar 2.2. Gen CYP2B6 (Atas) dan Gen CYP2C19 (Bawah).....	13
Gambar 2.3. Sintesis Hormon Tiroid	20
Gambar 2.4. Peta Lokasi Kalisoro di Kecamatan Tawangmangu	26
Gambar 2.5. Peta Lokasi Adipuro di Kecamatan Kaliangkrik	27
Gambar 2.6. Mekanisme Disrupsi Tiroid Akibat Paparan Klorpirifos.....	33
Gambar 2.7. Konsep Hubungan Paparan Kumulatif CPF terhadap Disrupsi Tiroid.....	34
Gambar 3.1. Gambaran Diskriminasi Alel Menggunakan Sinyal Fluoresensi dari TaqMan Probe.....	40
Gambar 3.2. Visualisasi Hasil PCR rs3745274.....	40
Gambar 3.3. Visualisasi Hasil PCR rs2279343.....	41
Gambar 3.4. Konfirmasi Sequencing Variasi genetik CYP2B6*6 (rs3745274 dan rs2279343).....	41
Gambar 3.5. Visualisasi Hasil RFLP CYP2C19	42
Gambar 3.6. Alur Penelitian	43
Gambar 4.1. Alur Rekrutmen Subjek Penelitian	51
Gambar 4.2. Konstruksi Model Analisis Jalur Faktor Risiko terhadap Kadar TSH	70
Gambar 4.3. Model Akhir Analisis Jalur Faktor Risiko terhadap Kadar TSH.....	70

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Naskah Penjelasan untuk Subjek Penelitian.....	133
Lampiran 2.	Lembar Persetujuan Keikutsertaan dalam Penelitian	136
Lampiran 3.	Rincian Kegiatan	137
Lampiran 4.	Pemeriksaan Kimia Rutin (Glukosa, ALT, AST, Kreatinin)	141
Lampiran 5.	Pemeriksaan Yodium Urin	142
Lampiran 6.	Pemeriksaan Fungsi Tiroid (TSH, FT4, Tiroglobulin).....	144
Lampiran 7.	Pemeriksaan Polimorfisme CYP2B6.....	145
Lampiran 8.	Pemeriksaan Polimorfisme CYP2C19 Genotipe *2 dan *3	146
Lampiran 9.	Prosedur Pemeriksaan AChE Eritrosit	152
Lampiran 10.	Pemeriksaan TCPy Urin	154
Lampiran 11.	Pemeriksaan PON-1	155
Lampiran 12.	Lembar Pemeriksaan Fisik	157
Lampiran 13.	Lembar Kuesioner Penelitian	158
Lampiran 14.	Skor Perhitungan Dosis Paparan Harian Berdasarkan Agricultural Health Study.....	161
Lampiran 15.	Lembar Silsilah Keluarga	163
Lampiran 16.	Kartu Kontrol Pemeriksaan Subjek	164
Lampiran 17.	Surat Keterangan Lolos Kaji Etik.....	165
Lampiran 18.	Amandemen Surat Keterangan Lolos Kaji Etik	166
Lampiran 19.	Izin Pengambilan Data Penelitian dari Kabupaten Karanganyar...	167
Lampiran 20.	Izin Kegiatan Penelitian dari Kabupaten Magelang	168
Lampiran 21.	Publikasi	169
Lampiran 22.	Manuskrip 1	Error! Bookmark not defined.
Lampiran 23.	Manuskrip 2	Error! Bookmark not defined.

DAFTAR SINGKATAN

AChE	: Asetilkolinesterase
APD	: Alat Pelindung Diri
BChE	: Butirilkolinesterase
CPF	: Klorpirifos
CPF-O	: Klorpirifos okson
CRH	: <i>Corticotropin releasing hormone</i>
CYP	: Enzim sitokrom P450
DDT	: <i>Dichlorodiphenyltrichloroethane</i>
DEP	: <i>Diethylphosphate</i>
DETP	: <i>Diethylthiophosphate</i>
DIT	: Diiidotirosin
DNA	: <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DPK	: Dosis Paparan Kumulatif
EYU	: Ekskresi Yodium Urin
FAM	: Frekuensi Alel Minor
FT3	: <i>Free T3</i> (hormon T3 bebas)
FT4	: <i>Free T4</i> (hormon T4 bebas)
MIT	: Monoiodotirosin
NIOSH	: <i>National Institute for Occupational Safety and Health</i>
NIS	: <i>Sodium/Iodide symporter</i>
OP	: Organofosfat
PAK	: Penyakit Akibat Kerja
PON-1	: Paraoksonase-1
SNP	: <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SUTAS	: Survei Pertanian Antar Sensus
T3	: Triidotironin (hormon T3)
T4	: Tiroksin (hormon T4)
TG	: Tiroglobulin
TCPy	: 3,5,6-trichloro-2-pyridinol
TRH	: <i>Thyrotropin Releasing Hormone</i>
TSH	: <i>Thyroid Stimulating Hormone</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Di Indonesia terdapat 27,6 juta rumah tangga usaha pertanian yang meliputi jumlah anggota rumah tangga 98 juta orang dan lebih dari 33 juta orang bekerja sebagai petani dan 24% petani perempuan.¹ Untuk membasmi hama pertanian petani menggunakan pestisida. Pada tahun 2010 terdapat 2605 pestisida terdaftar dan pada tahun 2016 bertambah menjadi 3207 pestisida yang terdiri atas insektisida, herbisida dan fungisida.²

Insektisida yang paling banyak digunakan adalah klorpirifos (CPF)³ dan paling sering digunakan pada pertanian sayur, bawang, cabai, kakao, kedelai, padi dan kacang. Kegiatan pertanian yang dilakukan petani menyebabkan mereka berisiko menerima pajanan pestisida. Cara kerja petani umumnya tidak aman sehingga berpotensi terpajan pestisida dosis tinggi dengan mencampur sedikitnya 2 jenis pestisida dan menyemprot dengan frekuensi melebihi anjuran.^{4,5}

Pajanan pestisida dapat mengganggu kesehatan dan sangat dipengaruhi oleh jenis bahan aktif. Pestisida organoklorin di antaranya endosulfan dan heptaklor memiliki efek *endocrine-disruptive* terhadap tiroid, karsinogenik, hingga gangguan perkembangan neurologis pada janin.^{6,7} Golongan OP seperti malation, paration, dimetoat, CPF target utamanya adalah sistem saraf pusat dan perifer melalui hambatan aktivitas enzim kolinesterase. Selain itu golongan OP dapat mengganggu metabolisme protein selular, kardiovaskular, sistem reproduksi, dan hormonal di antaranya gangguan tiroid.^{7,8}

Toksisitas CPF terjadi melalui serangkaian proses metabolisme di antaranya bioaktivasi menjadi metabolit aktif klorpirifos-okson dan detoksifikasi membentuk metabolit inaktif TCPy. Toksisitas CPF yang terjadi melalui ikatan dengan enzim asetilkolinesterase (AChE) menyebabkan enzim tersebut tidak berfungsi, sehingga menurunnya aktivitas AChE merupakan salah satu penanda pajanan CPF. Keseimbangan antara reaksi aktivasi dan detoksifikasi CPF dipengaruhi oleh usia, keberadaan bahan xenobiotik lain, aktivitas enzim paraoksonase-1 (PON-1) serta aktivitas enzim sitokrom P450 seperti CYP2B6 dan CYP2C19.^{9,10} Enzim sitokrom

P450 (CYP) yang berperan dalam sebagian besar metabolisme xenobiotik fase 1 di tubuh dan bersihannya tidak diekspresikan pada level yang sama untuk semua individu sehingga berdampak pada berbedanya respons individu terhadap xenobiotik. Individu dengan ekspresi CYP2B6 dan CYP2C19 tertentu memiliki kerentanan lebih besar untuk mengalami dampak paparan organofosfat.^{11,12} Sama halnya dengan individu yang memiliki kadar aktivitas enzim paraoxonase-1 yang rendah akan memiliki kerentanan yang lebih tinggi terhadap dampak paparan organofosfat.^{13,14}

Hingga saat ini bukti yang menunjukkan indikasi efek toksik langsung CPF terhadap organ atau jaringan selain sistem saraf masih terbatas. Studi eksperimental menunjukkan perubahan morfologis dan histopatologis pada tiroid hewan coba setelah dipaparkan CPF dengan dosis rendah. Menurunnya kadar hormon tiroid akibat paparan CPF diduga berhubungan dengan kerusakan sel folikular tiroid sehingga rangkaian proses sintesis hormon tiroid tidak dapat berjalan sempurna. Meskipun demikian, mekanisme pasti kerusakan tersebut belum dimengerti sepenuhnya.¹⁵⁻¹⁷ Tiroglobulin merupakan prekursor hormon tiroid dan sintesisnya pada folikel tiroid dipengaruhi oleh TSH. Keadaan ini mendasari pemikiran bahwa rasio tiroglobulin terhadap FT4 (rasio Tg/FT4) dapat menjadi indikator kerusakan struktur tiroid sekaligus menunjukkan ketidakseimbangan hormonal pada penyemprot pestisida dengan paparan utama CPF.

Penelitian epidemiologis mendapatkan peningkatan kadar TSH yang menunjukkan kondisi hipotiroid pada populasi terpajan pestisida. Prevalensi TSH yang meningkat dan kadar T4 normal pada populasi terpajan pestisida 15%,¹⁸ sedangkan berbagai studi melaporkan prevalensi goiter atau hipotiroid pada petani terpajan pestisida > 27%,¹⁹⁻²¹ jauh lebih tinggi dibandingkan prevalensi pada populasi umum di Indonesia yaitu 2,7% pada laki-laki dan 2,2% pada perempuan²² serta 11,3% di Mumbai India.²³

1.2 Identifikasi Masalah

Penggunaan insektisida CPF di Indonesia belum disertai cara yang benar dan aman sehingga berpotensi mengganggu kelenjar tiroid yang berperan vital dalam metabolisme, pertumbuhan dan perkembangan tubuh manusia. Paparan CPF pada penyemprot pestisida yang dinilai dengan dosis paparan kumulatif (DPK), kadar PON-1, AChE dan TCPy dalam interaksinya bersama variasi genetik CYP2B6, CYP2C19

sebagai penanda kerentanan individu terhadap pajanan CPF dapat menyebabkan disrupsi tiroid. Studi eksperimental hewan coba memberikan bukti kerusakan tiroid akibat CPF, namun studi epidemiologis yang mengaitkan penggunaan CPF dalam kejadian gangguan tiroid pada manusia masih sangat terbatas dan inkonklusif. Selain itu, di Indonesia hingga saat ini belum pernah dilakukan studi yang menempatkan variasi genetik CYP2B6 dan CYP2C19 sebagai biomarker kerentanan pajanan CPF pada populasi petani. Oleh karena itu, penelitian ini menjadi penting dalam bidang Kedokteran Okupasi terutama untuk deteksi dini dan penegakan diagnosis penyakit akibat kerja (PAK), khususnya disrupsi tiroid akibat pajanan CPF.

1.3 Pertanyaan Penelitian

1. Bagaimanakah karakteristik pajanan kumulatif pada penyemprot pestisida dengan pajanan utama CPF?
2. Bagaimanakah efek kegiatan terpajan pestisida terhadap kadar PON-1, AChE, dan TCPy pada penyemprot pestisida dengan pajanan utama CPF?
3. Bagaimanakah efek variasi genetik CYP2B6 dan CYP2C19 terhadap kadar metabolit TCPy pada penyemprot pestisida dengan pajanan utama CPF?
4. Bagaimanakah efek kegiatan terpajan pestisida terhadap TSH, FT4 dan rasio tiroglobulin/FT4 pada penyemprot pestisida dengan pajanan utama CPF?
5. Bagaimanakah pengaruh interaksi dosis pajanan kumulatif CPF, PON-1, AChE, TCPy, variasi genetik CYP2B6 dan CYP2C19 terhadap TSH, FT4 dan rasio tiroglobulin/FT4 pada penyemprot pestisida dengan pajanan utama CPF?

1.4 Hipotesis Penelitian

1. Kegiatan terpajan pestisida memengaruhi kadar PON-1, AChE, dan TCPy dalam urin pada penyemprot pestisida dengan pajanan utama CPF.
2. Variasi genetik CYP2B6 dan CYP2C19 memengaruhi kadar metabolit TCPy pada penyemprot pestisida dengan pajanan utama CPF.
3. Kegiatan terpajan pestisida memengaruhi TSH, FT4 dan rasio tiroglobulin/FT4 pada penyemprot pestisida dengan pajanan utama CPF.
4. Interaksi DPK, PON-1, AChE, TCPy, variasi genetik CYP2B6 dan CYP2C19 memengaruhi TSH, FT4 dan rasio tiroglobulin/FT4 pada penyemprot pestisida dengan pajanan utama CPF.

1.5 Tujuan Penelitian

1.5.1 Tujuan Umum

Memperjelas peran pajanan CPF berupa DPK, PON-1, AChE, TCPy bersama variasi genetik CYP2B6 dan CYP2C19 terhadap kejadian disrupsi tiroid pada penyemprot pestisida

1.5.2 Tujuan Khusus

1. Menganalisis karakteristik pajanan kumulatif pada penyemprot pestisida dengan pajanan utama CPF.
2. Menganalisis efek DPK terhadap PON-1, AChE, dan TCPy pada penyemprot pestisida dengan pajanan utama CPF.
3. Menganalisis peran variasi genetik CYP2B6 dan CYP2C19 terhadap kadar metabolit TCPy pada penyemprot pestisida dengan pajanan utama CPF.
4. Menganalisis efek DPK terhadap TSH, FT4 dan rasio tiroglobulin/FT4 pada penyemprot pestisida dengan pajanan utama CPF.
5. Menganalisis interaksi dosis pajanan kumulatif CPF, PON-1, AChE, TCPy, variasi genetik CYP2B6 dan CYP2C19 terhadap TSH, FT4 dan rasio tiroglobulin/FT4 pada penyemprot pestisida.

1.6 Manfaat Penelitian

1.6.1 Bagi Ilmu Pengetahuan

Memberikan sumbangan pengetahuan untuk melengkapi konsep mekanisme terjadinya disrupsi tiroid akibat pajanan CPF pada penyemprot pestisida. Selanjutnya, hasil penelitian diharapkan memunculkan potensi biomarker yang dapat digunakan dalam rangka deteksi dini agar dapat dilakukan upaya pencegahan dan tatalaksana bahaya potensial di tempat kerja sebelum terjadi manifestasi klinis atau efek kesehatan yang *non-reversible*. Penelitian ini juga dapat menjadi landasan bagi dimulainya penelitian lanjutan terkait dengan pajanan CPF dan dampak kesehatan yang ditimbulkannya.

1.6.2 Bagi Masyarakat

Memberikan sumbangan pengetahuan tentang dampak yang ditimbulkan oleh pajanan CPF pada tiroid sehingga dapat dijadikan sebagai dasar advokasi perubahan perilaku penggunaan pestisida pada petani dalam rangka mencegah terjadinya gangguan tiroid dan gangguan kesehatan lainnya di kemudian hari.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Insektisida Klorpirifos

2.1.1 Klasifikasi Pestisida

Pestisida adalah setiap bahan atau campuran bahan yang ditujukan untuk mengusir, mematikan, atau mengendalikan hama. Pestisida dapat digolongkan berdasarkan target spesies atau tujuan penggunaannya, di antaranya insektisida untuk membasmi hama serangga, herbisida membasmi tanaman pengganggu atau gulma, fungisida membasmi jamur, rodentisida digunakan untuk hama berupa hewan pengerat serta moluskisida sebagai pembasmi hama siput/keong.

Berdasarkan karakteristik toksikologi yang dipengaruhi oleh struktur kimianya, pestisida dapat dibagi menjadi golongan organofosfat, karbamat, organoklorin dan piretroid. Organofosfat (OP) dan karbamat merupakan insektisida yang bekerja melalui penghambatan enzim asetilkolinesterase (AChE). Termasuk dalam golongan OP di antaranya adalah CPF, malation, diklorfos dan paration. Karbamat dapat bekerja langsung menghambat AChE sementara OP memerlukan bioaktivasi ke dalam bentuk aktifnya sebelum dapat menghambat AChE.²⁴ Piretroid merupakan jenis pestisida yang digunakan sebagai insektisida pada sektor pertanian dan rumah tangga karena memiliki toksisitas yang rendah pada mamalia dan tidak menetap di lingkungan. Piretroid bekerja pada sistem saraf dengan mengganggu pengaturan kanal natrium di membran sel saraf target organisme menyebabkan paralisis dan hipereksitasi.²⁵

2.1.2 Profil Toksikologi Klorpirifos

Bentuk fisik CPF adalah kristal berwarna keputihan dengan bau tiol yang khas, menyerupai bau kandungan sulfur pada bawang putih, bawang, atau telur busuk. Rumus kimianya $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ dengan berat molekul 350,6 g/mol. Klorpirifos memiliki titik lebur pada 42 °C dan akan terdekomposisi pada suhu 160 °C. Kelarutan dalam air buruk sekali (0,0002%) namun dapat larut dalam pelarut organik seperti metanol dan isooktan. CPF diklasifikasikan dalam WHO Class II (*moderately hazardous*) dengan LD50 pada tikus sebesar 135 mg/kg BB.²⁶ Efek toksik pajanan CPF tidak ditimbulkan dari senyawa induknya, melainkan berasal

dari metabolit CPF. Klorpirifos akan mengalami detoksifikasi menjadi 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCPy) atau mengalami bioaktivasi menjadi CPF okson (CPF-O), yang merupakan inhibitor poten terhadap asetilkolinesterase (AChE) dan butirilkolinesterase (BChE).²⁷⁻²⁹ *EU Pesticides database* menyajikan data toksisitas CPF berupa ADI (*Acceptable Daily Intake*) 0,001 mg/kgBB/hari; ARfD (*Acute Reference Dose*) 0.005 mg/kgBB dan AOEL (*Acceptable Operator Exposure Level*) 0,001 mg/kgBB/hari.

Absorbsi

Klorpirifos diabsorbsi melalui semua rute pajanan. Absorbsi oral CPF pada manusia diperkirakan mencapai 70%, sementara absorbsi melalui kontak kulit hanya kurang dari 3%. Pajanan inhalasi merupakan pajanan yang paling cepat memunculkan tanda dan gejala diikuti oleh pajanan oral dan dermal. Penyerapan CPF melalui kontak kulit pada manusia tidak sebaik dibandingkan dengan penyerapan pada kulit hewan coba tikus karena CPF tidak dapat langsung terserap pada kulit manusia yang intak. Pada hewan coba, pajanan CPF melalui kulit memiliki potensi toksisitas yang rendah. LD50 pada kontak kulit untuk kelinci adalah sebesar > 5000 mg/kg dan > 2000 mg/kg untuk tikus. Kadar puncak TCPy setelah pajanan oral dan dermal dicapai dalam 6 dan 24 jam. Waktu paruh eliminasinya adalah 27 jam.²⁷

Distribusi

Klorpirifos terdistribusi ke seluruh jaringan tubuh setelah pajanan. Walaupun sebagian akan tersimpan dalam jaringan lemak, namun bioakumulasi nampaknya tidak berdampak bermakna karena waktu paruh eliminasinya yang cepat pada manusia yaitu kurang dari 3 hari. Konsentrasi tertinggi CPF terdapat dalam *fat and fatty tissues*. Klorpirifos juga berikatan dengan berbagai protein dalam sirkulasi seperti plasma albumin. Sebagai konsekuensinya, kadar CPF bebas dalam darah biasanya rendah.^{27,28}

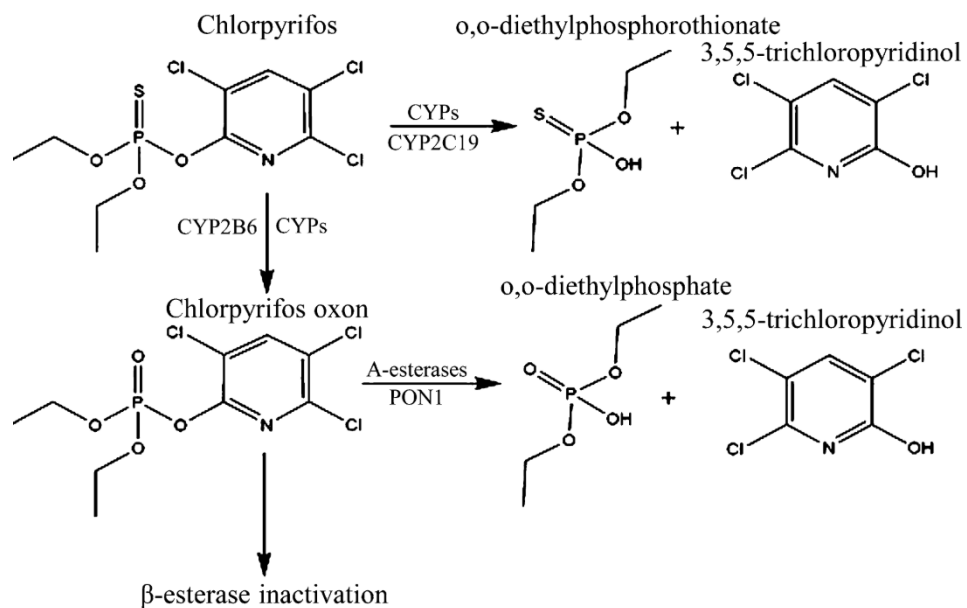
Metabolisme

Setelah masuk ke dalam tubuh, CPF diubah menjadi bentuk aktifnya yaitu dalam bentuk “OKSON” sebelum menimbulkan toksisitas lebih lanjut. Toksisitas CPF pada dasarnya merupakan hasil keseimbangan proses aktivasi dan detoksifikasi. Bioaktivasi sangat tergantung kepada reaksi oksidatif desulfurasi CPF menjadi

CPF-O oleh CYP, sebaliknya detoksifikasi CPF-O berlangsung melalui sejumlah jalur metabolisme di antaranya yang dimediasi oleh CYP, PON-1, dan B-esterase seperti karboksilesterase (CE) dan butirilkolinesterase (BChE). Enzim B-esterase akan terinhibisi setelah proses inaktivasi CPF-O, sementara A-esterase (PON-1) dapat menghidrolisis CPF-O dan tidak mengganggu fungsinya (*remain functional*).^{11,30} Pada manusia, beberapa enzim sitokrom P450 berperan besar dalam metabolisme CPF. Enzim yang paling aktif mengatalisis metabolisme CPF memiliki nilai bersihan intrinsik yang lebih tinggi. CYP2B6 memiliki *clearance intrinsic (CL int)* terbesar dalam bioaktivasi CPF menjadi CPF-O sementara CYP2C19 memiliki *CL int* terbesar untuk proses detoksifikasi CPF menjadi TCPy.^{9,10} Secara skematis jalur metabolisme CPF disajikan pada Gambar 2.1.

Ekskresi

Waktu paruh eliminasi CPF setelah pajanan oral atau dermal adalah 27 jam. Jalur eliminasi utama CPF adalah melalui ginjal. Metabolit CPF berupa TCPy, *diethylphosphate* (DEP), *diethylthiophosphate* (DETP) akan diekskresikan di dalam urin. Pembentukan metabolit DEP dan DETP tidak spesifik mencerminkan pajanan CPF karena metabolit ini juga ditemukan pada pajanan sejumlah pestisida OP lainnya. Ekskresi CPF pada hewan coba tikus setelah pajanan per oral adalah sebesar 90% melalui urin dan 10% melalui feses.^{27,29}



Gambar 2.1. Bioaktivasi dan Detoksifikasi Klorpirifos¹¹

2.1.3 Monitoring Biologis Paparan Klorpirifos

Asetilkolinesterase (AChE)

Target organ utama toksisitas akut OP adalah sistem saraf pusat dan perifer melalui penghambatan aktivitas enzim asetilkolinesterase. AChE adalah enzim yang bertanggung jawab dalam hidrolisis asetilkolin menjadi kolin dan asam asetat, dan hambatan pada enzim ini mengakibatkan berlimpahnya asetilkolin pada sinaps neuronal dan pada sambungan neuromuskular (*neuromuscular junction*). Asetilkolin ditemukan pada sistem saraf manusia, di antaranya pada sinaps kolinergik di sistem saraf pusat, sambungan neuron post-ganglionik parasimpatik di kelenjar eksokrin, otot polos dan otot jantung, neuron pre dan post-ganglionik sistem saraf autonom, sambungan neuromuskular sistem saraf somatik dan permukaan sel darah merah. Seperti halnya golongan pestisida OP lainnya, toksisitas CPF terjadi karena ikatan dengan asetilkolinesterase (AChE), atau dikenal dengan *red blood cell* (RBC-AChE), dan membuat enzim ini tidak berfungsi. Oleh karenanya, penurunan aktivitas hidrolisis AChE merupakan indikator terjadinya toksisitas dan sejauh ini selalu digunakan sebagai penanda paparan dan efek.^{30,31}

Karboksilesterase

Karboksilesterase (CE) merupakan glikoprotein yang mampu menghidrolisis sejumlah substrat. Pada manusia terdapat 2 bentuk utama CE yaitu hCE1 dan hCE2 dengan distribusi yang berbeda pada berbagai jaringan. Karboksilesterase pada manusia tidak ditemukan di dalam serum, melainkan terdapat pada sejumlah jaringan dalam konsentrasi yang lebih tinggi dari AChE maka CE juga diduga merupakan *metabolic scavengers* untuk CPF-O dan oleh sebab itu dapat mengurangi toksisitas CPF-O mengingat CPF-O menghambat enzim karboksilesterase melalui ikatan yang ireversibel.³¹

Butirilkinolinesterase (BChE)

Butirilkinolinesterase (BChE) plasma merupakan target ikatan CPF-O dan memiliki fungsi fisiologis yang penting. BChE atau juga dikenal sebagai *pseudocholinesterase* merupakan glikoprotein yang ditemukan pada jaringan manusia dalam jumlah yang berlimpah, disintesis di hepar dan memiliki usia sekitar 50 hari. Secara umum, BChE lebih cepat terinaktivasi dibandingkan AChE pada

pajanan CPF karena CPF-O berikatan lebih efektif dengan BChE dibandingkan AChE.^{31,32}

Trikloropiridinol (TCPy)

TCPy adalah metabolit utama CPF, sementara DEP dan DETP merupakan metabolit non-spesifik. Sama halnya dengan pestisida organofosfat lainnya, bahan aktif CPF memiliki toksisitas yang terbatas dan harus mengalami bioaktivasi melalui reaksi desulfurisasi untuk membentuk metabolit aktif berupa CPF-O. Klorpirifos dan CPF-O dapat mengalami proses detoksifikasi menjadi TCPy yang lebih hidrofilik sehingga dapat diekskresikan melalui urin.²⁸

Paraoksonase-1

Paraoksonase-1 (PON-1) merupakan bagian dari famili paraoksonase bersama dengan PON-2 dan PON-3. PON-1 merupakan glikoprotein yang terdiri atas 354 asam amino dengan berat molekul 43 kDa. Gen yang mengkode PON-1 pada manusia berada di lokasi antara q21.3 dan q22.1 pada lengan panjang kromosom 7.^{33,34} PON-1 disintesis di dalam hepar dan disekresikan ke plasma untuk berikatan terutama dengan HDL dan sejumlah kecil dideteksi berikatan dengan *very low-density lipoprotein* (VLDL) dan kilomikron. PON-1 memiliki aktivitas aterogenik dengan melindungi HDL dan LDL dari modifikasi oksidatif dan mengatalisis hidrolisis asam lemak teroksidasi pada lipoprotein dan arteri.^{33,35,36} Dari 3 enzim paraoksonase, hanya PON-1 yang memiliki aktivitas esterase dan berperan dalam reaksi hidrolisis beberapa jenis pestisida organofosfat. PON-1 memperoleh namanya karena kemampuannya dalam menghidrolisis paraokson, metabolit aktif insektisida paration, walaupun PON-1 lebih poten dalam hidrolisis metabolit aktif pestisida organofosfat lain seperti CPF-O dan diazokson.^{14,37}

Dalam metabolisme CPF (Gambar 2.1.) terdapat 2 kelompok enzim esterase yang berperan dalam proses detoksifikasi yaitu A-esterase yang mampu berperan dalam hidrolisis organofosfat, sementara B-esterase adalah enzim esterase yang dihambat oleh organofosfat. Contoh A-esterase adalah PON-1 yang mendetoksifikasi okson dalam hal ini CPF-O yang dihasilkan dari metabolisme fase 1 CPF dalam hepar menjadi DEP dan TCPy.³⁸ Sementara itu, BChE berperan sebagai *scavenger*

dengan terikat pada organofosfat dan memberi efek proteksi dengan mencegah toksisitas akibat inhibisi AChE.¹⁴

Aktivitas PON-1 dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti asupan nutrisi, gaya hidup, obat-obatan, lingkungan dan pengaruh terbesar dari polimorfisme genetik gen pengkodennya.^{33,39} Sejumlah obat diketahui meningkatkan kadar/aktivitas PON-1, di antaranya golongan obat statin. Konsumsi alkohol dalam dosis rendah memiliki dampak positif bagi PON-1 sekaligus memodulasi kadar HDL yang memberikan efek proteksi terhadap penyakit kardiovaskular. Sebaliknya, konsumsi alkohol dosis tinggi dan alkoholik kronik akan menurunkan aktivitas PON-1.⁴⁰ Diet kaya kolesterol dan asam lemak teroksidasi seperti lemak *trans*, asam lemak tak jenuh ganda (*polyunsaturated fatty acid – PUFA*) akan menurunkan aktivitas PON-1.^{40,41} Konsumsi diet tinggi kolesterol dan tinggi lemak berhubungan dengan respons inflamasi akibat peroksidasi lipid pada hepar yang menyebabkan inhibisi pada ekspresi gen PON-1, penurunan sintesis HDL, penurunan sekresi PON-1 dan penurunan aktivitas PON-1 pada serum.⁴¹ Sebaliknya, asam oleat dari minyak zaitun, konsumsi antioksidan atau bahan pangan yang kaya polifenol akan meningkatkan aktivitas PON-1. Asupan bahan yang memiliki efek antioksidan seperti vitamin C, vitamin E, teh hijau, jus pomegranat meningkatkan aktivitas / ekspresi PON-1 pada manusia.⁴⁰ Aktivitas PON-1 pada perokok lebih rendah dibandingkan dengan bukan perokok. Mantan perokok memiliki aktivitas dan konsentrasi PON-1 serum yang serupa dengan bukan perokok. Bahan kimia dari lingkungan di antaranya pajanan organofosfat dan logam berat menurunkan aktivitas PON-1.^{33,40}

Terdapat sekitar 400 *single nucleotide polymorphisms (SNPs)* pada gen PON-1 dan tidak semua SNPs berdampak bermakna pada ekspresi gen PON-1.³⁹ Polimorfisme yang utama pada PON-1 adalah Q192R dan L55M. SNPs Q192R berhubungan dengan aktivitas hidrolisis enzim PON-1 sehingga dapat memengaruhi efisiensi reaksi katalisis dalam metabolisme pestisida, sementara SNPs L55M mengubah kadar dan stabilitas protein PON-1 pada plasma sehingga memengaruhi aktivitas enzimatisnya.^{33,34,39}

2.2 Polimorfisme Genetik CYP2B6 dan CYP2C19

Informasi genetik yang terkandung dalam untaian *Deoxyribonucleic acid* (DNA) akan menentukan karakteristik spesifik suatu organisme. Untaian DNA tersusun atas nukleotida yang terdiri atas basa nitrogen, sebuah molekul gula pentosa, dan sebuah molekul fosfat. Ekspresi gen merupakan sebuah proses penerjemahan instruksi dalam DNA menjadi produk fungsional seperti protein. Perubahan dalam ekspresi gen dapat diakibatkan oleh adanya mutasi atau variasi genetik. Mutasi adalah perubahan pada informasi genetik yang dibawa oleh gen sementara variasi genetik (polimorfisme) secara sederhana dapat didefinisikan sebagai perbedaan atau variasi dalam sekuens DNA di antara 2 individu. *Single nucleotide polymorphisms* (SNPs) merupakan jenis variasi genetik yang paling umum ditemukan pada manusia. SNPs dapat muncul pada DNA manusia secara normal dalam arti tidak memiliki efek pada kesehatan atau perkembangan dengan rerata kemunculan 1 di antara 1000 nukleotida. Variasi ini dapat muncul pada area pengkodean (*coding region*) maupun pada area pengaturan (*regulatory region*).⁴²

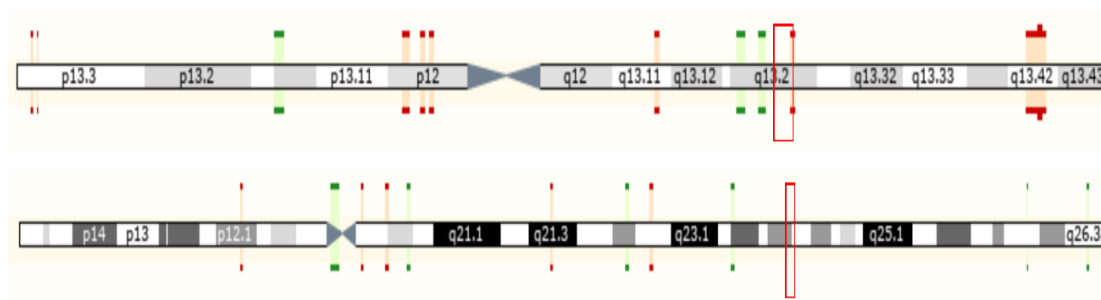
Perbedaan respons individu terhadap xenobiotik mungkin dipengaruhi oleh adanya polimorfisme genetik pada gen pengkode enzim yang berperan dalam metabolisme fase 1 dan fase 2, dalam hal ini enzim yang mengatalisis reaksi oksidasi dan konjugasi. Proses ini di satu sisi menyebabkan aktivasi xenobiotik sehingga terbentuk produk yang lebih reaktif dari senyawa asalnya namun sebaliknya juga dapat menyebabkan proses detoksifikasi dan memfasilitasi proses ekskresi selanjutnya.⁴³ Dengan demikian, variasi genetik dapat berdampak protektif atau sebaliknya meningkatkan kerentanan bagi subjek yang terpajan xenobiotik.^{38,43} Gen sitokrom P450 (CYP) berperan mengatalisis biotransformasi sejumlah xenobiotik. Terdapat 115 gen CYP dengan 57 di antaranya adalah gen fungsional dan 12 gen mengkode enzim yang bertanggung jawab atas > 75% oksidasi fase 1 obat-obatan yang digunakan secara klinis dan bahan kimia lainnya.^{12,43,44}

Polimorfisme pada gen CYP dapat memengaruhi ekspresi enzimnya dalam bentuk peningkatan atau penurunan aktivitas metabolismenya.⁴³ Variabilitas pada gen CYP P450 akan menghasilkan 4 fenotip berdasarkan kemampuan metabolismenya sebagai berikut:^{43,45}

- *Poor metabolizer*: membawa 2 alel varian tanpa aktivitas fungsional (*loss of function*)
- *Intermediate metabolizer*: membawa 1 alel varian dengan defisiensi fungsi yang menyebabkan penurunan aktifitas fungsional enzim
- *Extensive metabolizer*: dianggap sebagai fenotip yang normal, membawa 2 alel dengan aktifitas fungsional yang normal (*wild-type*)
- *Ultrarapid metabolizer*: memiliki kemampuan fungsional yang lebih tinggi

Di antara sejumlah gen CYP, CYP2B6 dan CYP2C19 pada Gambar 2.2. merupakan gen yang sangat polimorfik dan memiliki efek fungsional yang penting dalam metabolisme sejumlah obat dan bahan kimia termasuk pestisida.^{10,43} Enzim CYP2B6 adalah polipeptida yang terdiri dari 491 asam amino, merupakan satu dari sekian banyak enzim CYP pada manusia yang berperan utama dalam biotransformasi obat dan bahan xenobiotik lainnya. Gen CYP2B6 terletak dalam kluster gen CYP2 pada kromosom 19 (19q13.2) terdiri dari 9 ekson dan 8 intron. Hingga saat ini telah dapat diidentifikasi 38 variasi alel CYP2B6.⁴⁶ Gen CYP2C19 yang terdiri atas 9 ekson dan 8 intron terletak pada kromosom 10 (10q23.33). Enzim CYP2C19 tersusun atas 490 asam amino dan berperan dalam metabolisme berbagai bahan xenobiotik dan ditemukan terutama pada retikulum endoplasma di sel hepar. Enzim ini berperan penting dalam metabolisme sedikitnya 10% obat-obatan yang diresepkan.

Dalam proses metabolisme pajanan CPF, CYP2B6 dan CYP2C19 merupakan CYP yang paling aktif terlibat. CYP2B6 berperan dalam reaksi desulfurisasi (aktivasi) CPF sementara CYP2C19 pada reaksi dearilasi (detoksifikasi).⁴⁷ Oleh karena itu individu dengan ekspresi CYP2B6 yang tinggi dan CYP2C19 yang rendah lebih rentan mengalami dampak pajanan dan selanjutnya peningkatan atau penurunan ekspresi maupun aktivitas keduanya akan memengaruhi aktivitas enzim asetilkolinesterase (AChE)/ butirilkolinesterase (BuChE).¹¹ Varian CYP2B6 *6/*6, CYP2C19 *2/*2, *2/*3, *3/*3 merupakan kelompok *poor metabolizer*, sedangkan CYP2B6 *1/*6, CYP2C19 *1/*2, *1/*3 adalah *intermediate metabolizer*.



Gambar 2.2. Gen CYP2B6 (Atas) dan Gen CYP2C19 (Bawah)⁴⁸

Variasi genetik yang penting pada CYP2B6 adalah CYP2B6*6 sebagai kehadiran 2 polimorfisme 785A>G dan 516G>T secara bersamaan,⁴⁹ sementara itu varian *2 dan *3 merupakan variasi genetik yang relevan secara klinis pada CYP2C19.⁴³ Frekuensi *wild-type* gen CYP2B6 pada populasi di Asia Timur dan Asia Selatan berturut-turut adalah 75,5% dan 45%, sementara untuk CYP2C19 adalah 60,5% dan 51,9%.¹² Efek fungsional sejumlah varian CYP2B6 dan CYP2C19 disajikan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1. Efek Fungsional Varian CYP2B6 dan CYP2C19^{12,50}

Allel CYP	Kode rs	Varian (Efek protein)	Efek Fungsional	
2B6	*9	rs3745274	Missense (Q172H)	
	*6	rs2279343, rs3745274	Missense (K262R, Q172H)	Aktivitas menurun
	*2	rs8192709	Missense (R22C)	
	*5	rs3211371	Missense (R487C)	Aktivitas menurun
	*16	rs2279343, rs28399499	Missense (I328T)	Aktivitas menurun
	*18	rs28399499	Missense (I328T)	Aktivitas menurun
	*22	rs34223104	Regulatory	Aktivitas meningkat
	*4	rs2279343	Missense (K262R)	Aktivitas meningkat
2C19	*2	rs4244285	<i>Splicing defect</i>	Inaktif
	*3	rs4986893	Stop-gain (W212X)	Inaktif
	*17	rs12248560	Regulatory	Aktivitas meningkat
	*27	rs7902257	Regulatory	Aktivitas menurun
	*15	rs17882687	Missense (I19L)	
	*13	rs17879685	Missense (R410C)	
	*9	rs17884712	Missense (R144H)	

CYP2B6*9 dan *6 adalah variasi terbesar pada populasi di Asia Selatan dengan frekuensi mencapai 71%, sementara pada populasi di Asia Timur variasi terbesar adalah CYP2B6*9 dengan frekuensi 65,5% dan *2 (18,3%).¹² Walaupun lokus CYP2B6 sangat bervariasi, namun variasi alel yang menimbulkan konsekuensi fungsional relatif kecil. CYP2B6*6 memiliki kemiripan dalam aktivitas kinetik dengan CYP2B6*1 namun diekspresikan pada kadar lebih rendah sehingga kemampuan CYP2B6*6 dalam mengaktivasi pembentukan CPF-O secara bermakna lebih rendah dibandingkan dengan *wild type*. Hal ini terjadi karena *aberrant splicing* pada varian *6 menyebabkan hilangnya ekson 4–6, menghasilkan mRNA fungsional dengan jumlah dan fungsi yang sangat berkurang dengan konsekuensi ekspresi enzim yang rendah.⁵¹ Keadaan ini berpotensi menurunkan kerentanan terhadap paparan CPF.¹⁰

Frekuensi alel *wild-type* CYP2C19 adalah sebesar 60,5%. Variasi alel terbanyak pada CYP2C19 di populasi Asia adalah *2 dengan frekuensi variasi di atas 70%, diikuti oleh *17, dan *3. Variasi tipe *2 dan *3 adalah *null-allele* dengan konsekuensi hilangnya aktivitas enzim fungsional, sebaliknya *17 meningkatkan aktivitas metabolismenya.¹² CYP2C19*2 merupakan hasil transisi G>A pada posisi 681 di ekson 5 yang menyebabkan *splicing defect* pada pre-RNA yang memengaruhi asam amino proline di posisi 227. Sementara CYP2C19*3 berupa transisi G>A pada posisi 636 di ekson 4 merupakan *point mutation* yang penting karena menggantikan kodon triptofan TGG dengan TGA. Kedua varian menghasilkan *premature stop codon* dan tentu saja merupakan *non-functional protein*.^{45,52} Enzim CYP2C19 pada manusia adalah enzim P450 yang terlibat dalam detoksifikasi CPF menjadi TCPy. CYP2C19 juga terlibat dalam metabolisme pestisida OP lainnya dan pestisida piretroid selain CPF. Perlu diketahui walaupun CYP2B6 sangat memengaruhi proses bioaktivasi CPF dan sisi lain CYP2C19 pada proses detoksifikasi, namun pada dasarnya semua CYP yang mengatalisis biotransformasi CPF berperan dalam kedua reaksi bioaktivasi dan detoksifikasi pada tingkat tertentu. Frekuensi alel minor dan genotip varian CYP2B6 dan 2C19 pada berbagai populasi di Asia, Afrika dan Eropa disajikan pada Tabel 2.2. dan 2.3.⁵³⁻⁶¹

Tabel 2.2. Frekuensi Alel Minor Gen CYP2B6*4, *9, dan Frekuensi Genotip CYP2B6*6 pada Berbagai Populasi

Populasi studi	Besarsampel	FAM CYP2B6			Genotip CYP2B6*6		
		*4 (%)	*9 (%)	*1/*1 (%)	*1/*6 (%)	*6/*6 (%)	
Iran ⁵⁸	206	35,9	35,7	16,0	28,1	4,8	
Timor (Indonesia) ⁵⁹	96	46,9	56,8	39,6	37,5	22,9	
Turki ⁶⁰	172	32,6	28,2	27,0	23,8	8,7	
Mesir ⁶¹	120	30,4	28,8	44,2	37,5	7,5	
Han China ⁶²	193	27,5	20,5	50,8	24,4	2,1	
Spanyol ⁶³	180	27,0	23,0	35,5	25,0	5,5	
Kaukasia (Inggris) ⁶⁴	135	30,4	28,1	29,6	31,9	7,4	

Tabel 2.3. Frekuensi Alel Minor dan Frekuensi Genotip Gen CYP2C19*2 dan *3 pada Berbagai Populasi

Populasi studi	Besarsampel	FAM CYP2C19			Genotip CYP2C19		
		*2 (%)	*3 (%)	*1/*1 (%)	*1/*2 (%)	*1/*3 (%)	*2/*2 (%)
Thailand ⁶⁵	1205	25,6	2,5	48,2	37,9	3,5	5,3
Mesir ⁶¹	120	3,8	0,0	93,3	5,8	0,0	0,8
Han - China ⁶⁶	100	25,5	2,0	42,0	41,0	3,0	3,0

2.3 Dosis Paparan Kumulatif

Pajanan CPF pada petani dapat terjadi akibat aktivitas pekerjaannya (paparan okupasi) maupun kegiatan yang tidak berhubungan dengan pekerjaannya (non-okupasi). Sejumlah aktivitas pekerjaan petani sangat berpotensi untuk terpajan dengan CPF di antaranya adalah saat mempersiapkan, mencampur, mengaplikasikan, membersihkan atau memperbaiki peralatan penyemprotan, menangani percikan atau tumpahan, serta masuk ke area pertanian yang baru disemprot. Sementara paparan non-okupasi dapat berasal dari perilaku hygiene individu yang buruk seperti tidak mencuci tangan, tidak mengganti pakaian setelah melakukan aktivitas menggunakan pestisida (terpapar pestisida), tidak menggunakan alat pelindung diri (APD) yang adekuat, tidak menggunakan APD dengan benar, maupun melalui konsumsi pangan dan air yang mengandung residu pestisida. Petani juga dapat terpapar pestisida saat menyimpan produk pertanian yang telah diberi pestisida di dalam tempat tinggalnya. Dengan demikian terpenyuhilah 3 kemungkinan jalur masuk paparan pestisida pada manusia yaitu melalui kontak kulit, inhalasi, dan ingesti.²⁷

Potensi dampak kesehatan akibat paparan pestisida telah diketahui, oleh karena itu penentuan besarnya dosis paparan yang dialami pekerja selama kegiatan bekerja sangat penting untuk dilakukan. Namun, asesmen risiko paparan pestisida pada pekerja sektor informal seperti petani di pedesaan memiliki tingkat kesulitan tersendiri disebabkan beberapa hal di antaranya bahwa lingkungan kerja mungkin berada dekat dengan tempat tinggalnya, kemungkinan paparan non-okupasi lain yang telah dituliskan di atas, serta terpapar dengan *multiple pesticide exposure*, menggunakan lebih dari 1 jenis pestisida pada saat yang sama dengan cara mencampur beberapa jenis pestisida dalam 1 wadah.

Menilai besarnya paparan pestisida baik tunggal maupun ganda dalam sebuah pekerjaan adalah masalah yang sangat menantang dalam studi epidemiologis mengenai dampak kesehatan kronik bahan-bahan ini. Sejumlah strategi telah digunakan untuk mengatasi kesulitan tersebut di antaranya melalui pengembangan matriks paparan kerja (*Job Exposure Matrix*) maupun sistem skoring yang sayangnya hingga saat ini belum tersedia alat yang dapat menjawab kebutuhan tersebut.⁶² Dalam asesmen risiko paparan pestisida, besarnya risiko yang

ditimbulkan dari pajanan pestisida ditentukan oleh sejumlah faktor di antaranya tingkat toksisitas, jumlah dan cara pemajanan, durasi pajanan dan lama terpajan. Dosis pajanan kumulatif untuk setiap pestisida dihitung berdasarkan persamaan dalam Agricultural Health Study di bawah ini.⁶³

$$CD = IL \times D \times F$$

CD = Cummulative dose

IL (*Daily exposure intensity level*) = dosis pajanan harian

D (Durasi) = jumlah tahun bekerja melakukan aktivitas pengaplikasian pestisida

F (Frekuensi) = jumlah hari kerja per tahun untuk melakukan aktivitas pengaplikasian pestisida

Dosis pajanan harian (*daily exposure intensity level*) pestisida dinilai dengan memperhitungkan variabel-variabel berikut ini:

- Kegiatan mencampur pestisida (*mix*)
- Metode dalam mencampur pestisida (*enclosed*)
- Metode pengaplikasian pestisida (*appl*)
- Penggunaan kendaraan tertutup (*cab*)
- Melakukan perbaikan peralatan penyemprotan (*repair*)
- Melakukan pencucian peralatan penyemprotan (*wash*)
- Penggunaan alat pelindung diri (*PPE*)
- Penggantian sarung tangan (*repl*)
- Higiene individu (*hyg*)
- Penanganan tumpahan / percikan pestisida (*spill*)

Pada pengamatan dan wawancara menggunakan form di lampiran 13 didapatkan informasi mengenai variabel-variabel di atas dan kemudian diberikan skor sesuai dengan form penilaian pajanan harian pada lampiran 14. Keseluruhan skor tersebut kemudian dihitung dalam persamaan di bawah ini untuk memperoleh nilai dosis pajanan harian.

$$IL = [(Mix * Enclosed) + (Appl * Cab) + Repair + Wash] * PPE * Repl * Hyg * Spill$$

Asumsi yang dipergunakan adalah bahwa untuk setiap musim tanam tertentu (*particular period*) aktivitas pekerjaan yang dilakukan, pestisida yang digunakan, cara kerja, dan peralatan kerjanya serupa. Dengan demikian, hasil penilaian saat ini

akan memberikan gambaran besarnya pajanan dalam setiap periode dan dapat diakumulasikan menjadi pajanan kumulatif.

Bila dalam identifikasi diperoleh informasi bahwa pestisida yang digunakan lebih dari 1 macam, maka untuk setiap jenis pestisida yang digunakan akan dilakukan penilaian yang terpisah dalam rangka memperoleh gambaran pajanan multipel yang lebih menyeluruh. Termasuk di dalamnya adalah jenis pestisida yang tidak digunakan melalui penyemprotan misalnya fungisida untuk menjaga hasil panen dari jamur.

2.4 Kelenjar Tiroid

2.4.1 Anatomi & Fungsi Fisiologis Tiroid

Kelenjar tiroid adalah kelenjar endokrin yang terletak di leher bagian depan bawah dan terdiri atas 2 bagian lobus yaitu lobus kanan dan lobus kiri yang dihubungkan oleh istmus pada garis tengahnya. Pada setiap lobusnya tertanam kelenjar paratiroid. Di bawah mikroskop, jaringan tiroid terlihat sebagai susunan folikel berbentuk bulat, setiap folikel terdiri dari 1 lapis sel folikel yang mengelilingi lumen berisi koloid, terutama merupakan tiroglobulin. Sel folikel adalah sel epitel berbentuk gepeng, kubus, atau kolumnar. Bentuk dan ukuran sel itu dipengaruhi oleh aktivitas kelenjar tiroid, dalam keadaan inaktif akan berbentuk gepeng, sebaliknya akan berbentuk kubus atau kolumnar pada keadaan aktif. Koloid inilah yang menjadi pusat produksi hormon tiroid dan sangat tergantung dengan ketersediaan yodium.⁶⁴

Hormon tiroid sangat penting bagi manusia karena pada dasarnya hormon ini diperlukan dalam berbagai proses metabolisme manusia di antaranya laju metabolisme, respirasi selular hingga penggunaan energi serta memiliki peran vital dalam proses tumbuh kembang janin dan anak. Pada sistem kardiovaskular hormon tiroid berperan dalam memengaruhi curah jantung melalui peningkatan kontraktilitas miokard dan denyut jantung. Hormon tiroid juga berfungsi merangsang konsumsi oksigen pada sebagian besar organ tubuh, serta dalam regulasi metabolisme lemak dan karbohidrat. Ibu yang mengalami hipotiroid selama kehamilan dapat menyebabkan terjadinya gangguan perkembangan neuropsikologis pada janin.⁶⁵

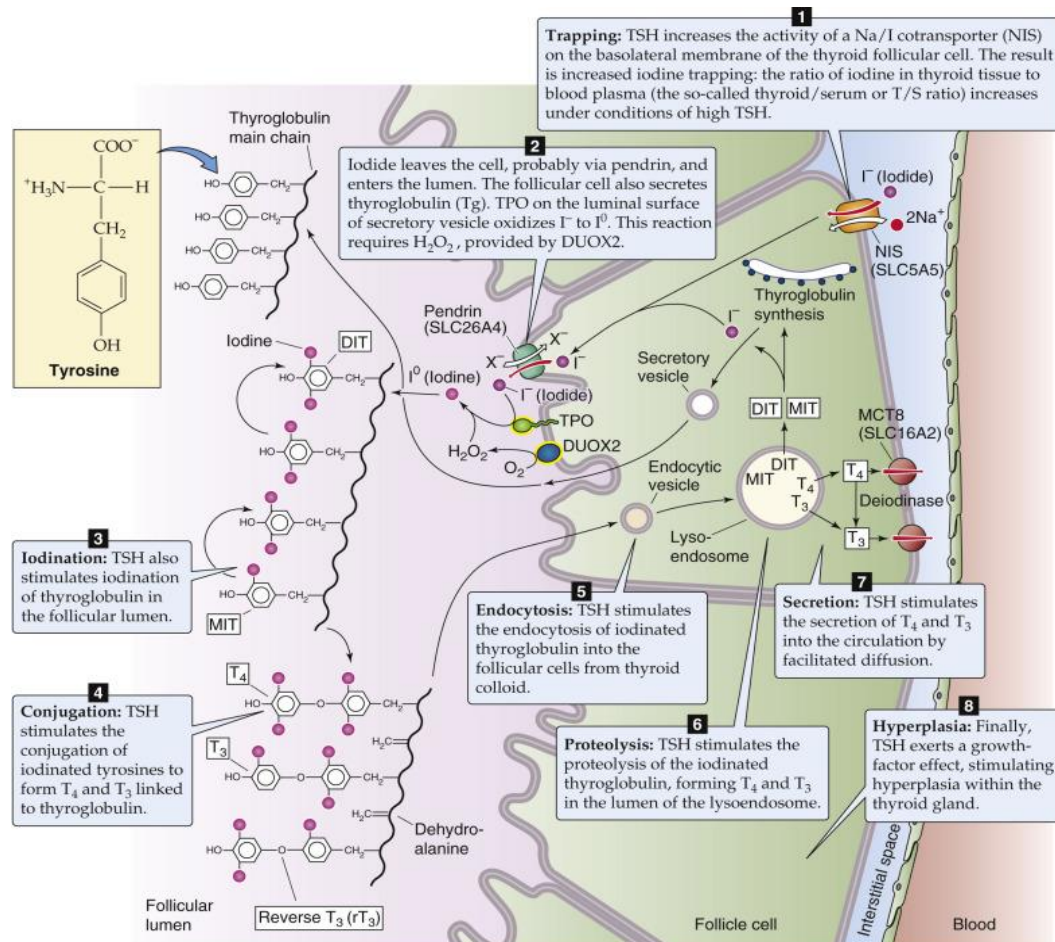
2.4.2 Sintesis Hormon Tiroid

Kelenjar tiroid menghasilkan hormon tiroid yaitu tiroksin (T4) dan triiodotironin (T3) yang berasal dari sintesis yodium dan tirosin dalam sel folikular tiroid melalui mekanisme umpan balik yang melibatkan *Thyroid Stimulating Hormone* (TSH). Sekresi TSH dikendalikan oleh *thyrotropin-releasing hormone* (TRH) yang disekresi oleh neuron hipotalamus ke dalam sawar darah hipotalamus-hipofisis. Agar dapat berfungsi melakukan pengaturan fungsi sekresi TSH, TRH harus menemukan reseptor yang sesuai pada tirotrop di hipofisis anterior sehingga dapat berfungsi menstimulasi sekresi TSH atau sebaliknya. Bila kadar hormon tiroid dalam darah tinggi, maka terjadi mekanisme umpan balik yang mengakibatkan penurunan kadar TSH.⁶⁶

Thyroid-stimulating hormone (TSH) merupakan glikoprotein yang dihasilkan oleh sel tirotrop di hipofisis anterior yang berperan utama dalam regulasi hormon tiroid. TSH terdiri atas 2 subunit yaitu alfa yang dapat ditemukan pada hormon TSH, *luteinizing hormone* (LH), *follicle-stimulating hormone* (FSH) maupun *chorionic gonadotropin* (CG), serta subunit beta yang unik dan spesifik.⁶⁷ Hormon TSH berikatan dengan reseptor pada permukaan sel folikular tiroid dan menstimulasi peningkatan ambilan yodida ke dalam sel tiroid, yodinasi residu tirosil pada tiroglobulin oleh tiroperoksidase, sintesis dan oksidasi tiroglobulin, ambilan tiroglobulin dari koloid, dan produksi T4 dan T3.

Hormon tiroid diproduksi di folikel tiroid dan dibentuk dari asam amino tirosin yang berikatan kovalen dengan iodin menghasilkan 2 hormon tiroid utama yaitu tiroksin (T4) dan triiodotironin (T3). Tahapan biosintesis tiroid ditampilkan dalam Gambar 2.3. dan dimulai dengan TSH yang berikatan dengan reseptor TSH untuk menginduksi transport aktif yodida dari sirkulasi ke dalam sel folikular tiroid melalui *Sodium/Iodide symporter* (NIS) di membran basalis. Melalui proses yang difasilitasi oleh pendrin, yodida selanjutnya memasuki ruang koloidal (*colloid space*) untuk mengalami oksidasi menjadi yodium dengan bantuan enzim tiroid peroksidase (TPO). Pada saat yang bersamaan, tiroglobulin yang merupakan sebuah protein tempat pembentukan dan penyimpanan hormon tiroid, disintesis dan kemudian melalui proses eksositosis disekresikan dari retikulum endoplasma di folikel ke dalam ruang koloidal. TSH menstimulasi proses organifikasi yodium dengan gugus tirosin pada tiroglobulin di dalam ruang koloidal yang menghasilkan monoiodotirosin (MIT)

dan diiodotirosin (DIT). Residu tirosin yang dihasilkan akan dipasangkan (*coupling*) membentuk hormon tiroid T4 dan T3 dengan dikatalisis oleh TPO. Dengan stimulasi TSH, tiroglobulin yang teriodinasi kemudian diserap dari ruang koloidal masuk ke dalam folikel melalui proses endositosis. Koloid yang menyatu dengan lisosom primer dan tiroglobulin kemudian mengalami proteolisis untuk melepaskan hormon T4 dan T3 yang siap disekresi ke sirkulasi.^{68,69}



Gambar 2.3. Sintesis Hormon Tiroid⁶⁸

(1) Aktivitas NIS meningkat untuk menangkap yodium dari sirkulasi (*trapping*); (2) TG dan yodida memasuki lumen folikel; (3) yodinasi TG di lumen folikel; (4) konjugasi residu tirosin menjadi T₄ dan T₃ pada TG; (5) endositosis TG ke dalam folikel; (6) proteolisis TG menghasilkan T₄ dan T₃; (7) sekresi T₄ dan T₃; (8) TSH menstimulasi hiperplasi pada kelenjar tiroid.

Hormon tiroid berfungsi melalui ikatan dengan sejumlah reseptor yaitu TR α 1, TR β 1, TR β 2. Reseptornya berada di sel epitelial tiroid dan menstimulasi kelenjar tersebut untuk melepaskan hormon tiroid.⁷⁰ Kelenjar tiroid berisi sejumlah besar T₄ dan T₃ yang tergabung dalam tiroglobulin dan dengan cara ini, T₄ dan T₃ dapat disekresi lebih

cepat saat dibutuhkan. Sebagian besar hormon tiroid yang disekresi kelenjar tiroid adalah T4 yang merupakan prekursor (prohormon) dan T3 yang juga dibentuk di jaringan perifer melalui deiodinasi T4.^{69,71} T4 umumnya terdapat dalam bentuk terikat dengan protein di dalam darah, sementara sisanya dalam jumlah yang sangat kecil berada dalam bentuk bebas tidak terikat dengan protein yang disebut sebagai *free* T4 (FT4). Sekitar 75% T4 terikat pada *thyroxine-binding globulin* (TBG), 15% terikat pada *transthyretin* (TTR) dan selebihnya terikat albumin.⁷⁰

Sejumlah besar T3 (sekitar 80%) dihasilkan dari proses deiodinasi T4 di jaringan perifer, terutama hati dan ginjal. Enzim deiodotironin deiodinase tipe 1 dan 2 (D1 & D2) mengubah T4 menjadi T3 dengan mengatalisis pelepasan yodium. Di sisi lain proses ini juga dapat menghasilkan *reverse* T3 (rT3) yang tidak aktif secara biologis dengan dikatalisis oleh enzim D3.⁷² Afinitas T3 terhadap reseptor tiroid lebih besar dibandingkan dengan T4, oleh karenanya T3 juga merupakan bentuk hormon tiroid yang aktif. Reseptor hormon tiroid ditemukan dalam jumlah yang cukup banyak pada hampir semua jaringan, terutama pada organ hati, jantung, dan otak.⁷¹

2.4.3 Hipotiroid

Hipotiroid adalah suatu kondisi produksi rendah hormon tiroid dan merupakan kelainan tiroid yang paling umum. Kondisi tersebut diketahui dengan melakukan pemeriksaan laboratorium di antaranya kadar *thyroid-stimulating hormone* (TSH) dan tiroksin bebas (FT4). TSH adalah hormon yang berfungsi merangsang kelenjar tiroid untuk memproduksi hormon tiroksin (T4) dan triiodotironin (T3) dan oleh karenanya TSH merupakan penanda utama fungsi tiroid. Pemeriksaan FT4 mengukur jumlah hormon tiroid yang tidak terikat, sementara pemeriksaan T4 total (TT4) mengukur keseluruhan T4 yang terikat dan yang tidak terikat. Pemeriksaan FT4 lebih bermanfaat dalam menegakkan diagnosis gangguan tiroid dibandingkan dengan TT4 karena FT4 mencerminkan hormon yang aktif dan dapat masuk ke dalam jaringan saat dibutuhkan.

Hipotiroid dapat dikategorikan menjadi hipotiroid *overt* dan hipotiroid subklinis (SH) berdasarkan nilai parameter pemeriksaan kadar (TSH) dan T4 bebas (FT4).⁷³ Hipotiroid *overt* adalah kondisi hipotiroid yang ditandai dengan peningkatan kadar TSH serum bersama dengan kadar FT4 serum yang rendah. Hipotiroid subklinis

atau hipotiroid ringan atau hipotiroid preklinis ditandai dengan peningkatan kadar TSH serum dan kadar FT4 normal. Hipotiroid subklinis dikategorikan berdasarkan peningkatan TSH serum menjadi peningkatan TSH ringan (4,0–10,0 mU/L) dan peningkatan berat (> 10 mU/L).^{73,74} Peningkatan kadar TSH serum hampir selalu menggambarkan kondisi berkurangnya suplai T4 atau T3. Prevalensi hipotiroid bervariasi dari beberapa studi mulai dari 0,3% hingga 5% di Eropa,⁷⁵ 3% dan 9% pada populasi wanita hamil di India⁷⁶, berturut-turut untuk hipotiroid *overt* dan SH.

Kondisi yang dapat menyebabkan gangguan di tiroid:

- Tiroiditis autoimun merupakan penyebab tersering kejadian hipotiroid. Kondisi ini merupakan peradangan kronik yang mengarah pada kerusakan kelenjar tiroid secara bertahap dan progresif, sehingga menyebabkan kelenjar tiroid tidak mampu menyintesis hormon tiroid yang cukup untuk memenuhi kebutuhan jaringan perifer.⁷⁷ Antibodi TPO ditemukan pada sekitar 90% penderita penyakit tiroid autoimun. Keberadaan antibodi TPO dapat menimbulkan kerusakan tiroid melalui mekanisme efek sitotoksik dan berperan sebagai inhibitor kompetitif aktivitas enzimatik TPO khususnya dalam sintesis hormon tiroid.⁷⁸
- Defisiensi yodium yang berat dapat menyebabkan hipotiroidisme karena yodium merupakan substrat vital untuk sintesis hormon tiroid. Tanpanya, sintesis tidak akan berjalan.
- Kelenjar tiroid akan mengalami sejumlah perubahan anatomis seiring dengan bertambahnya usia. Pada penuaan, kelenjar tiroid akan mengalami penurunan ukuran kelenjar, produksi hormon, aktivitas enzim deiodinase 1 disertai peningkatan metabolisme hormon di hati.⁷⁹
- Pada kondisi kehamilan mungkin ditemukan sejumlah perubahan fisiologis pada fungsi tiroid di antaranya kadar TT4, TT3 yang meningkat pada trimester pertama kehamilan, pembesaran tiroid diikuti dengan peningkatan tiroglobulin, serta dapat terjadi peningkatan ekskresi yodium sehingga produksi hormon tiroid menurun.⁸⁰
- Tiosianat (SCN^-) dan perklorat (ClO_4^-) merupakan inhibitor kompetitif ion yodida pada tiroid. Tiosianat yang juga dapat ditemukan pada asap rokok merupakan inhibitor yang poten dalam proses ambilan yodida serta juga berperan sebagai substrat kompetitif pada enzim TPO. Hambatan pada proses

trapping yodida menimbulkan efek yang serupa dengan defisiensi yodium mengingat bahwa yodium merupakan bahan dasar proses sintesis tiroid.⁶⁴

- Sejumlah bahan kimia di antaranya sulfonamid, propiltiourasil, metimazol, isoflavon berperan dalam menghambat enzim tiroperoksidase yang diperlukan dalam proses organifikasi hormon tiroid. Hambatan pada produksi enzim TPO juga disebabkan oleh sejumlah pajanan di antaranya fungisida seperti mancozeb dan etilentiourea, herbisida amitrole, serta benzophenone.⁸¹
- Asetaklor dan *Polychlorinated biphenyls* (PCBs) diduga menginduksi enzim uridin difosfat glukuroniltransferase (UDPGT) di hepar sehingga meningkatkan metabolisme T3 dan T4 serta menurunkan kadar hormon di sirkulasi.⁸¹ PCBs bersama dengan *Bisphenol-A* (BPA) juga merupakan bahan dengan dampak langsung di reseptor hormon tiroid. Struktur PCBs menyerupai hormon tiroid sehingga diduga akan berikatan dan berinteraksi dengan reseptor tiroid.⁸²

2.5 Hubungan Pajanan CPF, Polimorfisme Genetik, PON-1, Tiroglobulin dan Hormon Tiroid

Dalam sebuah penelitian eksperimental untuk mengetahui tingkat aktivitas enzim CYP pada pajanan CPF dengan menggunakan spesimen *human liver microsome* diketahui bahwa CYP2B6 dan CYP2C19 merupakan CYP yang teraktif dalam metabolisme CPF. CYP2B6 dan CYP2C19 berturut-turut menghasilkan CPF-O dan TCPy yang lebih tinggi dibandingkan dengan CYP lain seperti CYP3A4, CYP2C9, CYP2C8.⁴⁷ Penelitian eksperimental serupa memperoleh hasil bahwa kadar protein CYP2B6 pada spesimen varian CYP2B6*6 secara bermakna lebih rendah daripada spesimen CYP2B6*1 yang merupakan *wild type*. CYP2B6*6 juga memiliki tingkat pembentukan CPF-O yang lebih rendah, hanya sekitar 35% dibandingkan dengan CYP2B6*1.¹⁰

Pajanan pestisida secara kumulatif maupun non-kumulatif dapat memengaruhi kadar hormon tiroid terutama pada pria.¹⁸ Didapatkan hubungan antara kadar TCPy urin dengan kadar TSH dan FT4 pada pria yang terpajan dengan insektisida. Peningkatan kadar TCPy berbanding lurus dengan peningkatan TSH dan penurunan FT4.⁸³ Pajanan pestisida organofosfat yang ditandai dengan kadar dialkilfosfat berhubungan dengan peningkatan TSH dan penurunan T3 pada pekerja

floriculture.⁸⁴ Paparan pestisida gabungan pada petani kedelai berhubungan dengan peningkatan TSH dan penurunan kadar FT4 serum.⁸⁵

Aktivitas PON-1 berperan dalam mendetoksifikasi okson dalam hal ini CPF-O yang dihasilkan dari metabolisme fase 1 CPF dalam hepar menjadi DEP dan TCPy.³⁸ Tingkat aktivitas PON-1 ditentukan oleh sejumlah faktor di antaranya polimorfisme dengan polimorfisme yang utama pada PON-1 adalah Q192R dan L55M yang berhubungan dengan aktivitas hidrolisis enzim PON-1 sehingga dapat memengaruhi efisiensi reaksi katalisis dalam metabolisme pestisida atau mengubah kadar dan stabilitas protein PON-1 pada plasma sehingga memengaruhi aktivitas enzimatisnya.^{33,34,39,86}

Tiroglobulin berperan sebagai perancah sekaligus tempat penyimpanan bagi hormon tiroid.⁸⁷ Tiroglobulin (TG) dilepaskan dari sel-sel folikel tiroid dalam jumlah yang sebanding dengan sintesis dan pelepasan hormon T4 dan T3, serta peningkatan ukuran kelenjar. Rentang referensi pada subjek dengan kelenjar tiroid utuh dan kadar TSH normal adalah sekitar 3 hingga 40 ng/mL.⁷⁷ Tiroglobulin yang terdeteksi dalam plasma berperan sebagai penanda keberadaan jaringan tiroid yang aktif. Konsentrasi TG ditentukan oleh massa tiroid, stimulasi TSH dan manipulasi tiroid di antaranya pembedahan, aspirasi jarum halus (FNA), atau cedera tiroid. Pada gangguan tiroid seperti goiter dan hiperfungsi tiroid, peradangan atau cedera fisik pada tiroid, serta tumor tiroid akan didapatkan peningkatan kadar TG dan sebaliknya ketiadaan sebagian atau keseluruhan jaringan tiroid akibat pembedahan akan menyebabkan menurun atau tidak terdeteksinya TG.⁷⁰ Saat ini pemanfaatan pengukuran serum TG adalah sebagai penanda tumor pada pasien dengan kanker tiroid terdiferensiasi yang telah menjalani tiroidektomi.⁸⁷

Paparan pestisida selama bekerja didapatkan dari beberapa aktivitas saja di antaranya dalam kegiatan mencampur pestisida sebelum digunakan, pemindahan pestisida, pengaplikasian pestisida, dan dalam kegiatan membersihkan peralatan yang digunakan. Pekerja juga dapat terpapar melalui kegiatan memotong ranting maupun saat memanipulasi tanaman yang mungkin saja masih terkontaminasi dengan pestisida.⁸⁸ Kadar TSH pada penyemprot pestisida yang terpapar dengan organofosfat atau organoklorin secara bermakna lebih tinggi dibandingkan dengan

kelompok yang tidak terpajan, sebaliknya kadar T3 dan T4 pada kelompok terpajan lebih rendah dibandingkan kelompok tidak terpajan.⁸⁹ Riwayat penggunaan pestisida organoklorin, organofosfat, dan herbisida berhubungan dengan peningkatan risiko hipotiroid pada petani yang terpajan dengan pestisida selama bekerja.⁷ Tikus yang terpajan dengan CPF dosis rendah menunjukkan penurunan kadar T4 serum dan perubahan pada ukuran sel folikular tiroid.¹⁵ Penurunan kadar hormon T4 pada tikus juga didapatkan dengan pajanan CPF-metil.¹⁶ Pajanan CPF-metil menyebabkan penurunan kadar T4 dan kerusakan histologis jaringan tiroid berupa vakuolisasi atau nekrosis sel epitelial folikular tiroid.^{15,16} Hasil serupa didapatkan pada tikus albino yang diberikan pajanan CPF, diperoleh berupa bukti kerusakan jaringan tiroid berupa penurunan ukuran folikel, penurunan jumlah koloid dan degenerasi folikel bersama dengan peningkatan kadar TSH dan penurunan T4.⁹⁰ Hasilnya menunjukkan kerusakan jaringan tiroid yang mengganggu sintesis hormon tiroid. Kadar TCPy urin memiliki asosiasi negatif dengan TT4 dan kadar tiroglobulin. Hal ini menunjukkan bahwa pajanan CPF diduga memiliki kemampuan untuk menyebabkan gangguan pada tiroid.⁹¹

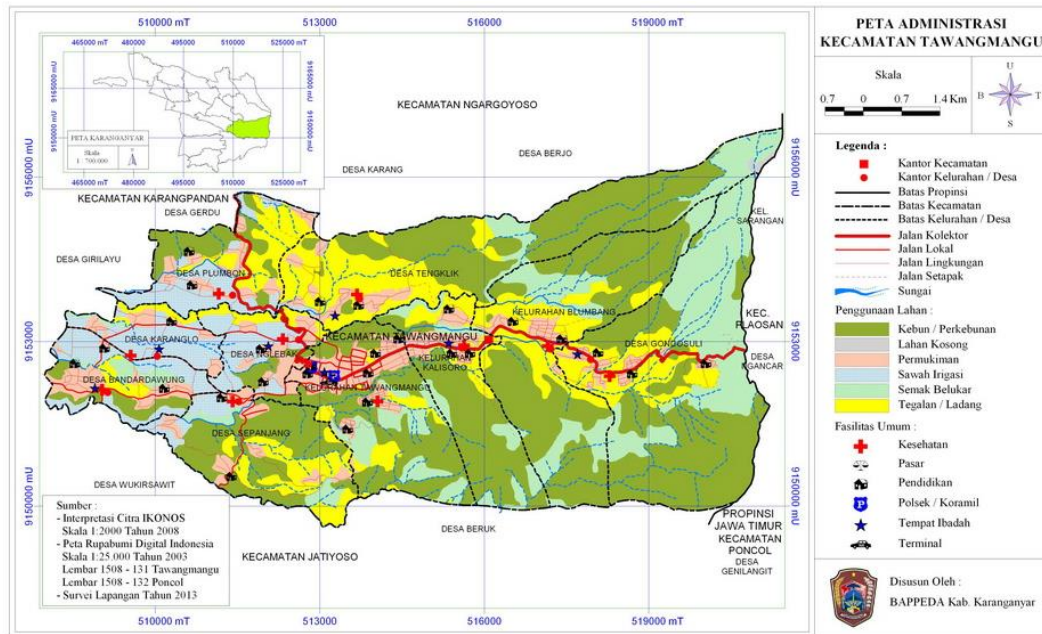
2.6 Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di sentra pertanian bawang putih dan sayur di Jawa Tengah yang terletak pada dataran tinggi. Dusun Pancot, Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karang Anyar Jawa Tengah dan Desa Adipuro, Kecamatan Kaliangkrik, Kabupaten Magelang, Jawa Tengah merupakan sentra pertanian bawang putih dan sayur di Jawa Tengah dengan cukup banyak petani yang aktif bercocok tanam dan bergabung dalam kelompok tani sehingga oleh karenanya dipilih untuk menjadi lokasi penelitian. Di bawah ini adalah gambaran dari lokasi tersebut.

2.6.1 Dusun Pancot

Gambar 2.4. menunjukkan Dusun Pancot yang terletak di Kelurahan Kalisoro, Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Kelurahan Kalisoro merupakan 1 dari 3 kelurahan yang berada di Kecamatan Tawangmangu yang berlokasi di lereng gunung Lawu dengan rerata ketinggian 1212 meter di atas permukaan laut. Kelurahan Kalisoro memiliki luas wilayah 10,52 Km² dan berbatasan di sebelah utara dengan Desa Tengklik, sebelah timur dengan Kelurahan

Blumbang, Kecamatan Jatiyoso di sebelah selatan dan Kelurahan Tawangmangu di sebelah barat.

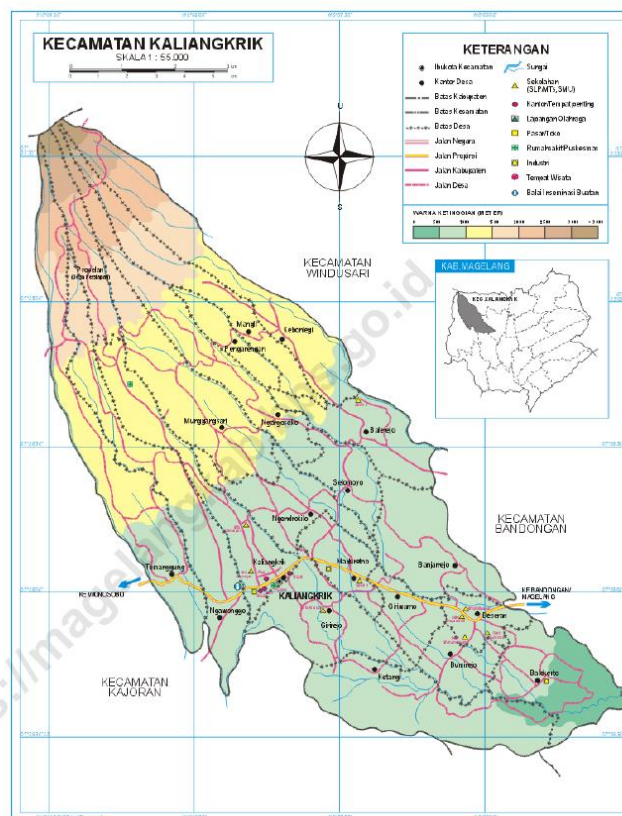


Gambar 2.4. Peta Lokasi Kalisoro di Kecamatan Tawangmangu⁹²

Jumlah penduduk Kalisoro sebanyak 4227 orang terdiri atas 2060 orang laki-laki dan 2167 orang perempuan. Walaupun tingkat pendidikan penduduknya kebanyakan adalah lulusan SD, namun sudah cukup banyak penduduknya yang berpendidikan setingkat SLTA atau lebih tinggi. Mata pencaharian utama adalah pedagang sebanyak 1995 orang dan 1054 orang sebagai petani. Hasil pertanian di Kalisoro terdiri atas beberapa komoditas, yang utama berasal dari Dusun Pancot adalah bawang putih, dan sejumlah komoditas lain seperti bawang daun, wortel, dan cabai.

2.6.2 Desa Adipuro

Desa Adipuro pada Gambar 2.5. merupakan salah satu dari 20 desa yang berada di wilayah Kecamatan Kaliangkrik, Kabupaten Magelang yang dipimpin oleh seorang Kepala Desa. Berlokasi di lereng Gunung Sumbing dengan rerata ketinggian 1339 meter di atas permukaan laut, Adipuro memiliki luas wilayah 2,95 Km² dan memiliki batas wilayah di sebelah utara, timur, selatan dan barat berturut-turut dengan tanah Perhutani, Desa Munggangsari, Desa Kaliangkrik serta Desa Temanggung.



Gambar 2.5. Peta Lokasi Adipuro di Kecamatan Kaliangkrik⁹³

Desa Adipuro terdiri dari 2 dusun yaitu Dusun Prampelan I dan Dusun Prampelan II dengan jumlah penduduk pada tahun 2019 sebanyak 3114 orang terdiri atas 1495 perempuan dan 1619 laki-laki dari 932 keluarga (KK). Mayoritas penduduk berpendidikan setingkat SD sementara di sisi lain hanya sedikit yang tamat SLTA atau lebih tinggi. Sebagian besar penduduk bermata pencaharian sebagai petani yaitu sebanyak 1349 orang dengan komoditas pertanian utama bawang putih, bawang merah, bawang daun, tembakau, kol, cabai, dan brokoli.

2.7 Profil Petani Bawang

Indonesia memiliki sejumlah besar wilayah dengan lahan yang digunakan untuk pertanian. Pertanian bawang di Indonesia tersebar di sejumlah daerah baik di Jawa, Sumatera, Nusa Tenggara dan Sulawesi. Pada umumnya pertanian bawang putih dan sayuran berada di daerah dengan ketinggian di atas 600 meter di atas permukaan laut. Siklus tanam pada tanaman bawang adalah 90–120 hari dengan rentang waktu tanam terbaik pada bulan Mei-Juli, tergantung pada varietas bawang putih yang ditanam dan kecukupan pasokan air untuk mengairi lahan. Pada

umumnya petani bawang hanya menanam bawang 1 kali dalam 1 tahun dan merotasi dengan tanaman lain untuk mengembalikan kesuburan tanahnya.

Kebanyakan petani merupakan pekerja penuh waktu dalam bidang pertanian. Mereka memperoleh ketrampilannya secara turun temurun dan dewasa ini mereka kerap memperoleh pendampingan cara bercocok tanam dengan efektif melalui pengetahuan yang dibagikan oleh kelompok-kelompok tani setempat. Oleh karenanya, kemiripan dalam tata kelola lahan, penggunaan benih, pemilihan pupuk serta penggunaan pestisida kimia dapat dengan mudah dijumpai antara satu petani dengan petani lainnya dalam satu kelompok tani atau gabungan kelompok tani.

Berdasarkan panduan budidaya bawang putih yang dirilis oleh Kementerian Pertanian Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Jatim,⁹⁴ aktivitas usaha tani yang dilakukan oleh petani bawang putih adalah sebagai berikut:

1. Perbenihan

Memilih benih yang akan ditanam, varietas disesuaikan dengan lokasi penanaman, agroklimat daerah tersebut. Untuk dapat digunakan sebagai benih, umbi bawang putih harus memperoleh perlakuan selama sekitar 4 bulan setelah masa panen. Setelah masa tunggu tersebut, umbi bawang putih harus dipisahkan dengan siungnya karena siung inilah yang akan digunakan sebagai benih bawang putih. Siung yang telah dipisahkan dari umbi direndam dengan fungisida sesuai dosis yang dianjurkan untuk mencegah serangan patogen jamur fusarium.

2. Persiapan lahan

Sebelum penanaman, lahan yang akan digunakan harus diolah terlebih dahulu. Tanah tersebut dicangkul dan diolah dengan diberi campuran pupuk kandang dan pupuk kompos. Tanah yang asam harus dinetralkan terlebih dahulu. Derajat keasaman tanah (pH) yang paling disukai adalah 6,5–7,5.

3. Penanaman

Waktu yang paling tepat untuk penanaman bawang putih adalah bulan Mei sampai dengan Juli. Bawang putih dapat tumbuh dengan baik pada lingkungan yang memiliki suhu harian antara 15–20 °C, curah hujan antara 100–200 mm/bulan, intensitas matahari yang cukup serta kelembapan udara antara 60–80%. Jarak tanam yang umum digunakan adalah sekitar 15 x 10 cm untuk setiap siung. Pada setiap lubang berkedalaman tertentu,

2–3 cm untuk siung kecil dan 5–7 cm untuk siung besar, ditanam 1 bibit dengan 2/3 bagian siung terbenam ke tanah pada posisi tegak lurus.

4. Pemeliharaan

Kegiatan pemeliharaan meliputi penyiangan gulma, pemupukan, pengairan, dan pengendalian hama serta penyakit tanaman. Pemberian pupuk susulan pada tanaman bawang putih dilakukan sebanyak 3 kali selama masa tanam yaitu saat tanaman berumur 15 –35 – dan 50 hari setelah tanam. Penyiraman dan pengairan dilakukan 2–3 hari sekali pada fase awal pertumbuhan. Pada masa pembentukan tunas sampai pembentukan umbi pengairan dilakukan antara 1–2 minggu sekali dan baru dihentikan saat pembentukan umbi maksimal atau sekitar 10 hari menjelang panen. Seperti halnya dengan tanaman pertanian lainnya, tanaman bawang juga rentan terhadap serangan hama, oleh karenanya petani menggunakan pestisida untuk mengendalikan hama tersebut. Pengendalian organisme pengganggu tanaman dilakukan di antaranya dengan menggunakan insektisida sesuai anjuran, melakukan pemasangan perangkap lekat, atau pada saat tanaman baru tumbuh hingga berusia 10 minggu. Frekuensi penyemprotan yang disarankan adalah 1 kali dalam seminggu dengan menggunakan insektisida yang sesuai dengan jenis organisme penggangguannya dalam takaran penggunaan yang tepat.

5. Panen.

Panen merupakan proses pengambilan umbi bawang putih yang sudah menunjukkan ciri masak optimal yaitu perubahan warna tangkai daun dari hijau segar menjadi kekuningan yang bukan disebabkan oleh penyakit. Bawang putih yang siap panen harus cukup umur yaitu berkisar antara 90–120 hari. Sehari sebelum panen lahan disirami dan digemburkan untuk mempersiapkan proses pencabutan tanaman bawang putih pada keesokan harinya. Tanaman yang dicabut harus sampai semua umbi terangkat dan kemudian diikat sebanyak 30 tangkai tiap ikat dan dikumpulkan di tempat teduh.

6. Pascapanen

Kegiatan pascapanen meliputi kegiatan pengeringan, pembersihan, sortasi, penyimpanan dan pengemasan. Lama pengeringan berkisar antara 10 hingga 15 hari. Bawang putih yang baru dipanen ini dapat dikeringkan dengan beberapa cara di

antaranya dikeringkan langsung di bawah sinar matahari atau dikeringanginkan di udara terbuka di lokasi yang teduh maupun pengeringan dengan menggunakan alat pengering mekanis. Penyortiran dilakukan untuk mengelompokkan umbi-umbi bawang putih menurut ukuran dan mutunya sebelum dipergunakan lebih lanjut. Hanya umbi yang telah kering dan dibersihkan yang akan disortir. Penyimpanan bawang putih dapat dilakukan dalam jumlah kecil maupun besar. Dalam jumlah kecil, bawang putih dapat disimpan dengan cara digantung ikatannya di atas para-para di dapur sehingga setiap kali ada aktivitas memasak, bawang putih akan terkena asap. Bila jumlah bawang putih yang disimpan sangat besar diperlukan gudang yang harus memiliki ventilasi udara yang baik dengan suhu ruangan berkisar 25–30 °C dan kelembaban 60–70%. Bawang putih yang siap untuk didistribusikan dimasukkan dalam karung goni, karung plastik atau anyaman tertentu sebelum diangkat dengan menggunakan berbagai alat transportasi seperti gerobak, becak, sepeda maupun kendaraan bermotor. Sebagian hasil panen dapat disimpan sebagai bakal benih untuk periode tanam berikutnya.

2.8 Kerangka Teori

Kerangka teori mekanisme disrupsi tiroid akibat pajanan CPF ditampilkan pada Gambar 2.6. Petani dapat terpajan CPF melalui kontak kulit, inhalasi maupun ingesti. Besarnya DPK akan diestimasi dengan memperhitungkan sejumlah faktor di antaranya aktivitas pekerjaannya, penggunaan alat pelindung yang adekuat, hygiene individu, durasi dan frekuensi kerja. DPK dalam interaksinya bersama faktor risiko lainnya diduga dapat menimbulkan manifestasi hipotiroid.

Metabolit CPF (CPF-O) merupakan metabolit aktif yang menimbulkan dampak kesehatan, dan pembentukannya dipengaruhi oleh sejumlah faktor di antaranya aktivitas CYP2B6 dan CYP2C19. CYP2B6 berperan dalam proses aktivasi CPF menjadi CPF-O, sementara CYP2C19 berperan dalam detoksifikasi CPF menjadi metabolit inaktif spesifik yaitu TCPy sehingga CYP2B6 dan CYP2C19 dapat berperan sebagai biomarker kerentanan yang memengaruhi risiko terjadinya disrupsi tiroid akibat pajanan CPF. Variasi genetik CYP2B6*6 serta CYP2C19*2 dan *3 akan menghasilkan penurunan aktivitas enzimatis namun memiliki implikasi yang berbeda. Individu dengan variasi genetik CYP2B6*6 memiliki tingkat aktivitas

enzimatik yang lebih rendah dibandingkan dengan *wild-type* sehingga CPF-O yang terbentuk juga lebih rendah. Sebaliknya, variasi genetik CYP2C19*2 dan *3 dengan tingkat aktivitas yang lebih rendah akan berdampak pada menurun atau tidak efektifnya proses detoksifikasi CPF menjadi TCPy. Oleh karena itu, TCPy yang dihasilkan merupakan biomarker pajanan dalam hubungannya dengan besarnya dosis pajanan yang diterima oleh tubuh setelah mengalami bioaktivasi dan inaktivasi oleh enzim sitokrom P450 (CYP) serta enzim esterase seperti PON-1.

Target utama toksisitas akibat pajanan CPF adalah inhibisi AChE mengakibatkan berlimpahnya asetilkolin pada sinaps kolinergik di SSP. Stimulasi kolinergik memicu meningkatnya sekresi *corticotropin releasing hormone* (CRH) yang menyebabkan peningkatan sekresi TSH.⁹⁵

Pengaruh DEP, metabolit non-spesifik OP, terhadap hormon tiroid secara *in silico* diduga berhubungan dengan sistem transduksi sinyal dan fungsi regulasi hormon tiroid yang menyebabkan gangguan pada biosintesis, ikatan reseptor dan regulasi sinyal hormon tiroid.⁹⁶ Berdasarkan hasil studi tersebut, CPF diduga dapat berikatan dengan reseptor hormon tiroid menyebabkan tidak adekuatnya ambilan hormon tiroid pada organ dan menciptakan kondisi hipotiroid yang akan mencetuskan mekanisme umpan balik pada hipotalamus maupun hipofisis.

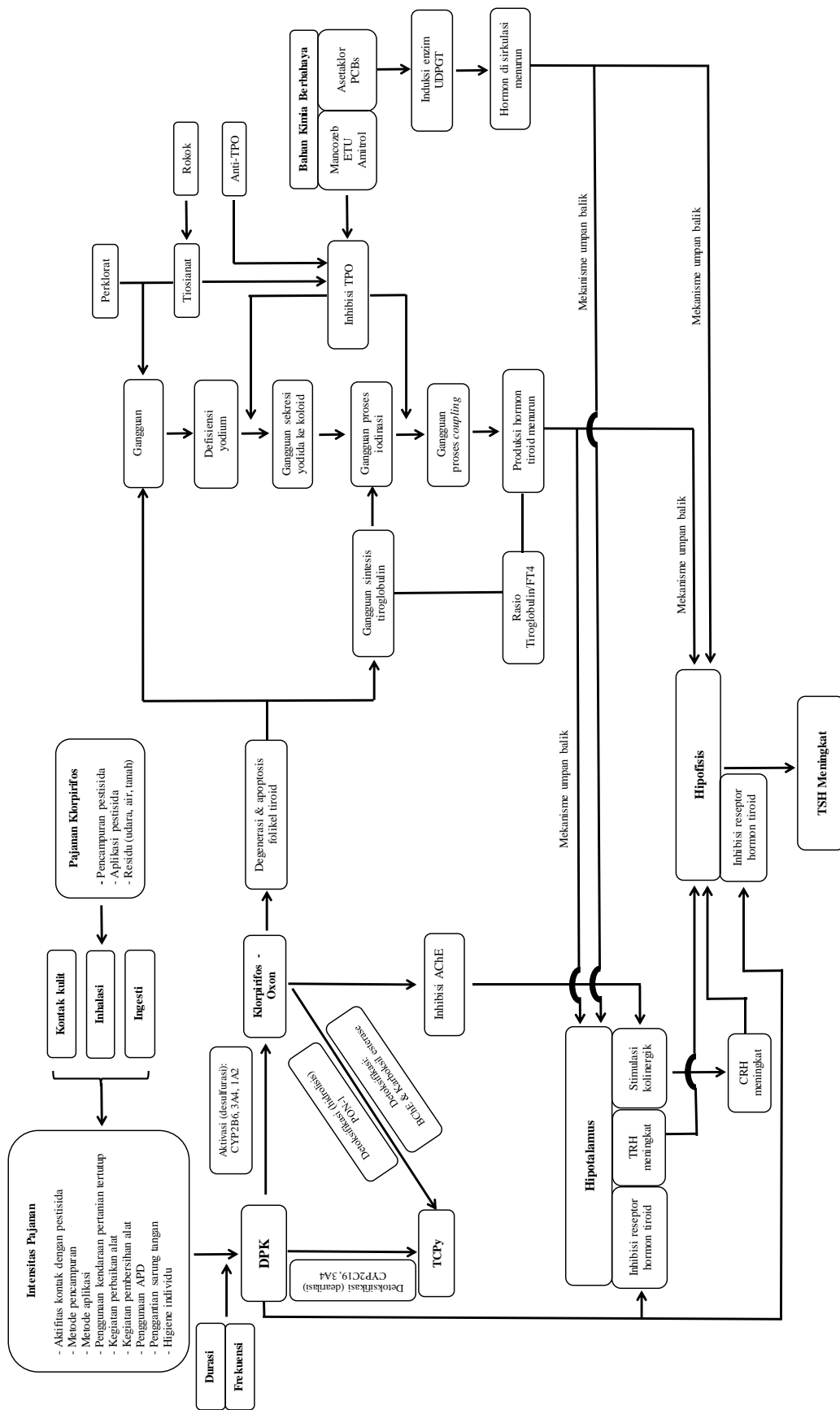
CPF-O diduga menyebabkan kerusakan struktur tiroid, sehingga ambilan yodida, proses organifikasi dan *coupling* tidak dapat berlangsung dengan optimal dan menurunkan produksi hormon tiroid. Kadar hormon tiroid yang rendah di sirkulasi memberikan umpan balik yang menghasilkan peningkatan TSH. Kerusakan struktur folikel tiroid juga dapat menyebabkan gangguan pada sintesis tiroglobulin. Gangguan pada sintesis hormon tiroid dan sintesis tiroglobulin akan menyebabkan menurunnya kadar hormon tiroid di sirkulasi sehingga dapat terjadi perubahan rasio Tg/FT4 yang menunjukkan ketidakseimbangan hormonal.

Tiosianat (SCN^-) dan perklorat (ClO_4^-) merupakan inhibitor kompetitif ion yodida pada tiroid. Tiosianat yang juga dapat ditemukan pada asap rokok merupakan inhibitor yang poten dalam proses ambilan yodida serta juga berperan sebagai substrat kompetitif pada enzim TPO. Hambatan pada proses *trapping* yodida menimbulkan efek yang serupa dengan defisiensi yodium mengingat bahwa yodium

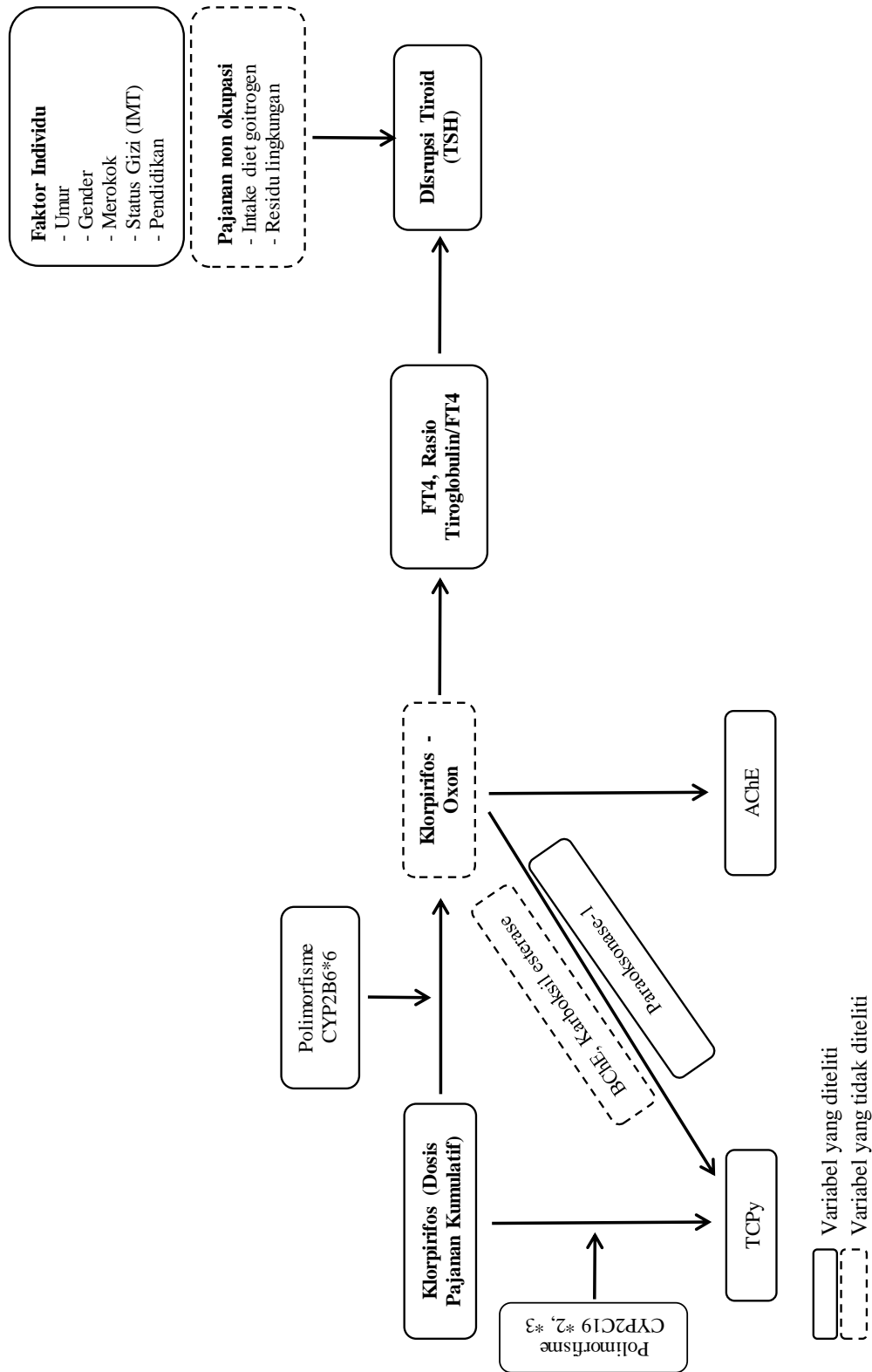
merupakan bahan dasar proses sintesis tiroid.^{97,98} Hambatan pada produksi enzim TPO yang berperan dalam proses organifikasi hormon tiroid juga dapat disebabkan oleh sejumlah pajanan di antaranya fungisida seperti mancozeb dan etilentiourea, herbisida amitrol, serta benzofenon. Asetaklor dan PCBs diduga menginduksi enzim UDPGT di hepar sehingga meningkatkan metabolisme T3 dan T4 dengan akibat menurunnya kadar hormon di sirkulasi.⁸¹ Keberadaan antibodi TPO juga dapat berperan sebagai inhibitor kompetitif aktivitas enzimatik TPO dalam sintesis hormon tiroid.⁷⁸

2.9 Kerangka Konsep

Konsep penelitian ini (Gambar 2.7.) adalah pajanan kumulatif CPF dapat menyebabkan disrupsi tiroid yang ditandai dengan kadar TSH yang tinggi. Interaksi variabel yang berkontribusi yaitu pajanan kumulatif, markah kerentanan (CYP2B6 dan CYP2C19), PON-1, AChE, dan TCPy dianalisis untuk membuktikan dampak pajanan CPF di tiroid (TSH, FT4, rasio tiroglobulin/FT4).



Gambar 2.6. Mekanisme Disrupsi Tiroid Akibat Paparan Klorpirifos



Gambar 2.7. Konsep Hubungan Paparan Kumulatif CPF terhadap Disrupsi Tiroid

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Desain, Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain potong lintang. Penelitian dilakukan di sentra pertanian bawang putih di Dusun Pancot, Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karang Anyar Jawa Tengah dan Desa Adipuro, Kecamatan Kaliangkrik, Kabupaten Magelang, Jawa Tengah. Pemilihan lokasi di Tawangmangu dan Kaliangkrik dengan pertimbangan bahwa lokasi ini merupakan sentra pertanian bawang putih dan sayur di Jawa Tengah dan memiliki cukup banyak petani aktif yang bergabung dalam kelompok usaha tani. Prospek subjek penelitian di Dusun Pancot berjumlah sekitar 300 orang sementara di Desa Kaliangkrik sekitar 400 orang. Penulisan usulan penelitian dimulai sejak bulan Juli 2019 dan pengumpulan data dilakukan pada bulan Juli–Oktober 2020. Analisis data dan penulisan laporan penelitian berlangsung sejak bulan Desember 2020 hingga Juli 2021.

3.2 Populasi, Kriteria Sampel dan Besar Sampel Penelitian

3.2.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah petani penyemprot pestisida CPF dan populasi target petani penyemprot pestisida CPF berusia 18–65 tahun. Populasi terjangkau adalah petani penyemprot pestisida CPF berusia 18–65 tahun di sentra pertanian bawang putih dan sayuran di Tawangmangu dan Kaliangkrik, Jawa Tengah.

3.2.2 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Kriteria Inklusi

- Usia subjek 18–65 tahun
- Terpajan CPF selama bekerja, minimal selama 1 tahun terakhir
- Bersedia berpartisipasi secara sukarela dalam studi yang ditandai dengan menandatangani *informed consent* (lembar persetujuan setelah penjelasan)

Kriteria Eksklusi

- Memiliki nilai fungsi ginjal (kreatinin) melebihi 1,5 $\mu\text{g/dL}$
- Memiliki nilai enzim fungsi hati (ALT/AST) di atas 2x nilai batas atas rujukan

- Menderita defisiensi yodium derajat sedang atau berat yang dinilai dengan pemeriksaan EYU < 50 µg/L
- Ibu hamil atau kurang dari 1 tahun setelah melahirkan
- Memiliki riwayat gangguan tiroid, operasi tiroid

3.2.3 Besar Sampel

Besar sampel diperhitungkan dengan rumus uji hipotesis terhadap rerata 2 populasi independen dan uji perbedaan 2 proporsi independen.

$$n_1 = n_2 = 2 \left[\frac{(Z\alpha + Z\beta)s}{(x_1 - x_2)} \right]^2$$

s = simpang baku berdasarkan pustaka ^{32,84,99}

Besar sampel minimal untuk perhitungan di atas adalah:

Parameter	Za	Zb	x1-x2	SD	Besar Sampel
TCPy	1,96	0,842	1,5	2,97	124
AChE	1,96	0,842	0,3	0,62	135
PON1	1,96	0,842	180	367	131

Asumsi yang digunakan untuk uji beda proporsi adalah sebagai berikut:¹²

- Frekuensi alel SNPs CYP2B6*6 dan 2B6*9 pada populasi Asia Timur 18,7%
- Frekuensi alel SNPs CYP2C19*2 dan 2C19*3 pada populasi Asia Timur 37,7%
- Perbedaan yang dianggap penting adalah 0,20.

$$n_1 = n_2 = \left[\frac{Z\alpha\sqrt{2PQ} + Z\beta\sqrt{P_1Q_1 + P_2Q_2}}{P_1 - P_2} \right]^2$$

$P = (P_1 + P_2) / 2$ dan $Q = 1 - P$

Perhitungan besar sampel minimal menggunakan rumus di atas:

Parameter	P1	Q1	P2	Q2	Besar Sampel
CYP2B6	0.19	0.81	0.01	0.99	85
CYP2C19	0.38	0.62	0.18	0.82	156

Besar sampel minimal dalam penelitian ini adalah 156 subjek.

3.3 Cara Kerja Penelitian

Kegiatan pengumpulan data penelitian ini berlangsung dengan Protokol Etik nomor 20-03-0336 dan memperoleh Surat Keterangan Lolos Kaji Etik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia tanggal 23 Maret 2020 dengan nomor KET-339/UN2.F1/ETIK/PPM.00.02/2020 serta Amandemen protokol penelitian nomor ND-997/UN2.F1/ETIK/PPM.00.02/2020 tanggal 31 Agustus 2020 yang terlampir sebagai lampiran 17 dan 18.

Subjek penelitian berasal dari 2 lokasi yaitu Dusun Pancot, Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar dan Desa Adipuro, Kecamatan Kaliangkrik, Kabupaten Magelang yang merupakan sentra pertanian bawang putih dan sayur di Jawa Tengah. Izin penelitian dari Dinas Kesehatan Kabupaten Karanganyar telah diperoleh tanggal 29 Mei 2020 melalui surat bernomor 005/1784.4.5/V/2020 sementara Izin Penelitian dari Dinas Penanaman Modal dan Pelayanan Terpadu Satu Pintu Kabupaten Magelang nomor 070/285/16/2020 diperoleh tanggal 1 September 2020 (lampiran 19 dan 20). Dalam pelaksanaannya, kegiatan ini berlangsung dalam koordinasi dengan Puskesmas Kecamatan Tawangmangu, Lurah Kelurahan Kalisoro, Kepala Desa Adipuro dan kelompok tani yang ada di lokasi tersebut. Peneliti juga berkoordinasi dengan tim pendukung penelitian yang terdiri dari tim lab penguji dari Prodia Solo, Prodia Magelang, Prodia OHC Cikarang, dan Prodia IndTox Lab.

Teknis Kegiatan Penelitian

Persiapan lapangan untuk kegiatan pengumpulan data di Dusun Pancot berlangsung pada tanggal 13–19 Juli 2020 dan dilanjutkan dengan kegiatan rekrutmen pada 20 Juli–13 Agustus 2020. Rekrutmen subjek dilakukan dengan dukungan dari Gabungan Kelompok Tani di Dusun Pancot, Kecamatan Tawangmangu yang memfasilitasi pertemuan antara calon subjek dengan peneliti melalui alokasi waktu yang diberikan untuk peneliti memperkenalkan diri dan memberi penjelasan tentang kegiatan penelitian ini dalam pertemuan bulanan anggota kelompok tani. Isi penjelasan detail terdapat pada lampiran 1. Setiap calon subjek yang berkenan untuk berpartisipasi dalam penelitian ini akan menjalani serangkaian kegiatan lanjutan berupa penandatanganan lembar persetujuan setelah penjelasan (lampiran 2), pemeriksaan fisik (sesuai lampiran 12), wawancara, mengisi kuesioner

(lampiran 13–15) serta pengambilan spesimen darah dan urin sebanyak maksimal 2 kali. Kartu kontrol pada lampiran 16 dipergunakan untuk memantau tahapan yang telah dijalani oleh peserta penelitian. Rincian kegiatan terdapat pada lampiran 3 laporan penelitian ini.

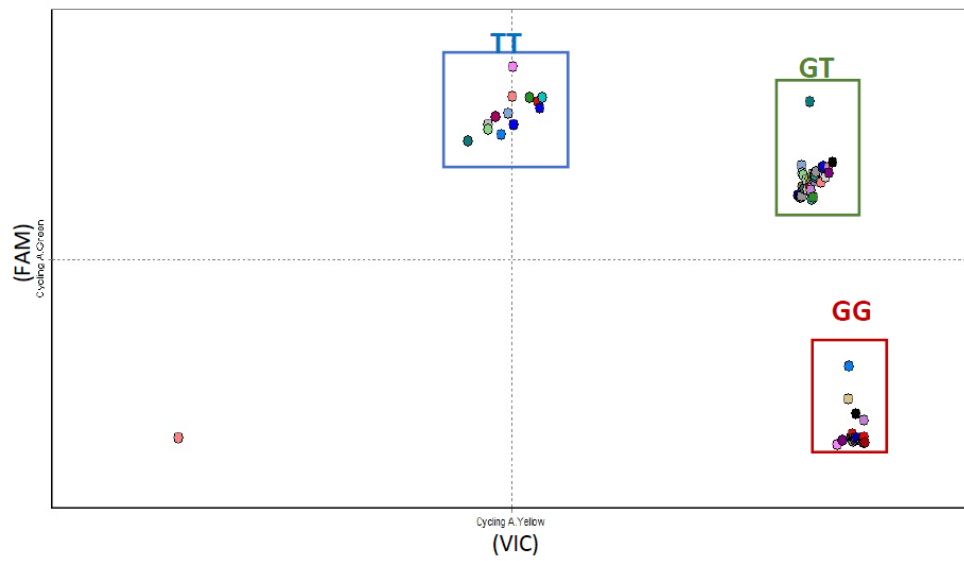
Mengingat kondisi pandemi COVID-19 yang tengah berlangsung serta keterbatasan waktu yang diberikan dalam acara tersebut, peneliti hanya berkesempatan mengumpulkan form persetujuan keikutsertaan dari calon subjek yang memenuhi kriteria dan bersedia berpartisipasi dalam penelitian ini serta menjadwalkan kembali sesi pertemuan untuk wawancara, pemeriksaan fisik, dan pemeriksaan laboratorium. Sebagian besar calon subjek yang memperoleh penjelasan ternyata tidak memenuhi kriteria untuk berpartisipasi dalam penelitian ini karena berusia lebih dari 65 tahun atau petani yang tidak rutin melakukan aktivitas penyemprotan pestisida atau tidak menggunakan pestisida CPF.

Proses rekrutmen subjek penelitian di Desa Adipuro dimulai dengan persiapan pada tanggal 14–15 September 2020 dan kegiatan rekrutmen berlangsung pada 17 September–8 Oktober 2020. Sama halnya dengan kegiatan di Dusun Pancot, kegiatan di Desa Adipuro juga sangat didukung oleh kelompok tani yang ada. Sebagian besar calon subjek yang datang memenuhi undangan untuk mendengarkan penjelasan peneliti ternyata tidak memenuhi kriteria untuk berpartisipasi karena 2 alasan utama yaitu tidak melakukan aplikasi CPF karena sedang berada dalam kondisi tidak bertani akibat pasokan air untuk tanaman tidak tersedia atau calon subjek berusia lebih dari 65 tahun.

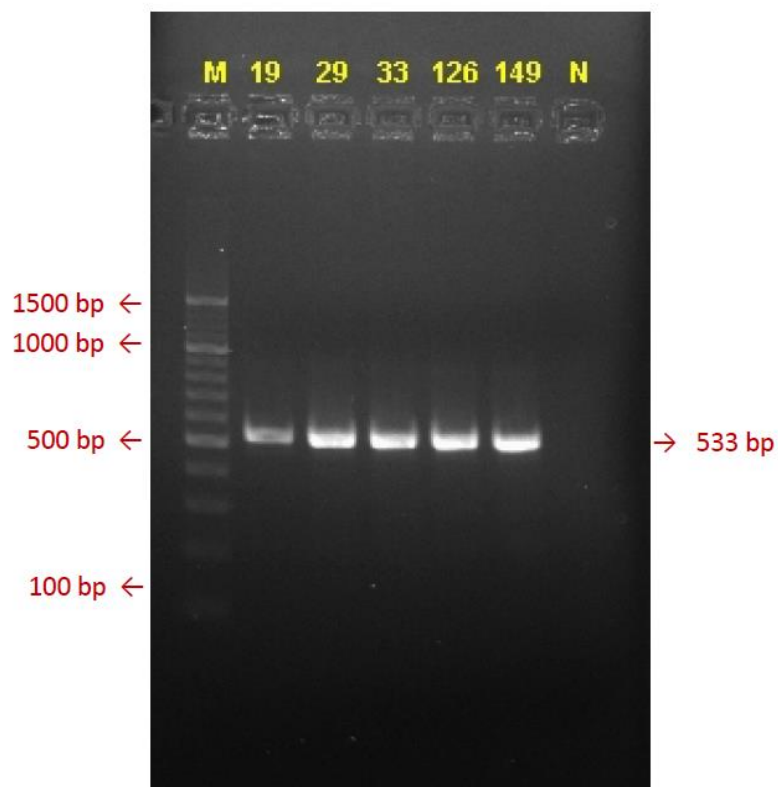
Pemeriksaan laboratorium (lampiran 4–11) dalam penelitian ini dilakukan dengan dukungan Laboratorium Klinik Prodia, Prodia OHC Cikarang dan Prodia *Industrial Toxicology Laboratory*. Pemeriksaan kreatinin, glukosa sewaktu, SGOT, SGPT merupakan parameter pemeriksaan kimia rutin yang diperiksa menggunakan reagen diagnostik pada alat Proline R-910 sesuai metode standar dari pabrikan. Pemeriksaan TSH, FT4 dan tiroglobulin dilakukan dengan metode *Electrochemiluminescence Immunoassay* (ECLIA) menggunakan reagen diagnostik berturut-turut Elecsys TSH, Elecsys FT4 III, dan Elecsys Tg II pada alat Roche Cobas e-411 sesuai protokol pabrikan dan standar pemeriksaan laboratorium.

Pemeriksaan yodium urin (EYU), PON-1, AChE dan TCPy dilakukan oleh Prodia *Industrial Toxicology Laboratory*. Yodium urin diperiksa dengan modifikasi metode CDC 3002.1¹⁰⁰ menggunakan *Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS)*. Pemeriksaan PON-1 dalam serum dilakukan dengan spektrofotometri menggunakan nitrofenol sebagai standar. Larutan standar dan sampel dibaca pada panjang gelombang 405 nm. Aktivitas AChE eritrosit ditentukan secara fotometri dengan metode Ellmann. TCPy urin dideteksi dalam sampel urin sewaktu menggunakan spektrometer massa *triple quadrupole Agilent Ultivo (LC-MS-MS Agilent Technologies, Singapura)* dengan program perangkat lunak *Mass-hunter* untuk akuisisi dan analisis data. Prosedur ekstraksi dilakukan berdasarkan adaptasi metode Smith et.al.¹⁰¹, sementara prosedur pemisahan (separasi) dan deteksi menggunakan modifikasi prosedur CDC 6103.03.¹⁰² Pemisahan dilakukan berdasarkan prinsip kromatografi menggunakan *Agilent High Performance Liquid Chromatography (HPLC Infinity 1260, Jerman)*. Konsentrasi TCPy yang terdeteksi dikoreksi dengan kreatinin urin.

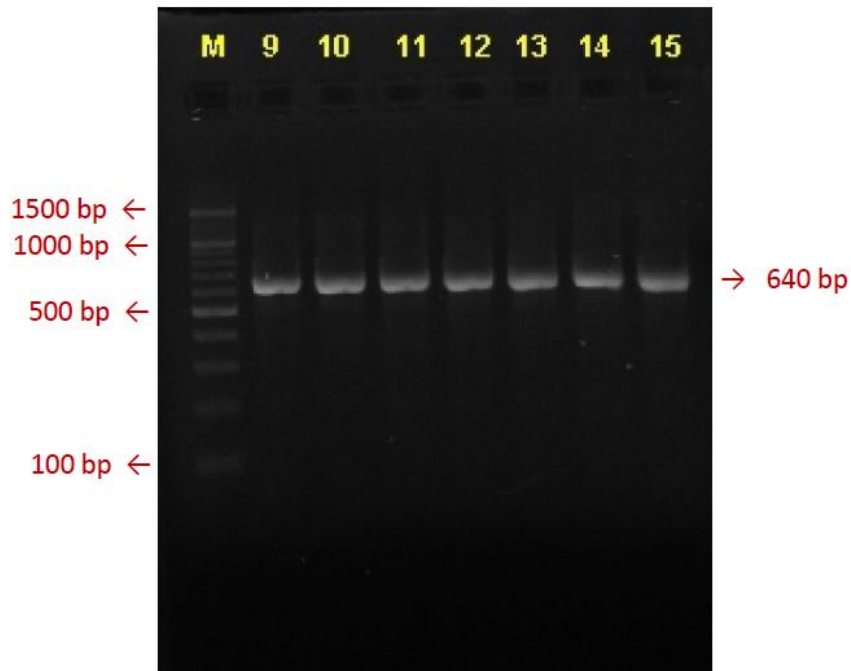
Analisis CYP2B6 – 516G>T (rs3745274) dilakukan dengan menggunakan *primer TaqMan® SNP Genotyping Assay C__7817765_60 (Applied Biosystems, CA, USA)* dan *thermocycler Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH, Germany)*. *Master mix PCR* menggunakan *TaqMan GTXpress Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA)*. Reagen yang digunakan diperuntukkan hanya bagi penelitian (*research use only*). Genotip ditentukan berdasarkan sinyal fluoresens dari *TaqMan probe* sesuai petunjuk pabrikan (Gambar 3.1.). Sebanyak 6 sampel menjalani pemeriksaan DNA sekuensing menggunakan *PCR product 533bp (Gambar 3.2.)* sebagai bagian dari validasi hasil pemeriksaan di atas. Genotipe CYP2B6 – 785A>G (rs2279343) dianalisis dengan menggunakan metode sekuensing Sanger. Sampel diamplifikasi dengan *PCR* menggunakan *primer* seperti yang digambarkan dalam studi sebelumnya oleh Zakeri et.al.⁵³ dan menghasilkan produk *PCR 640 bp (Gambar 3.3.)*. Seluruh metode sekuensing dikerjakan oleh *1st BASE DNA Sequencing Division, Apical Scientific Sdn Bhd, Selangor, Malaysia. (Gambar 3.4.)*



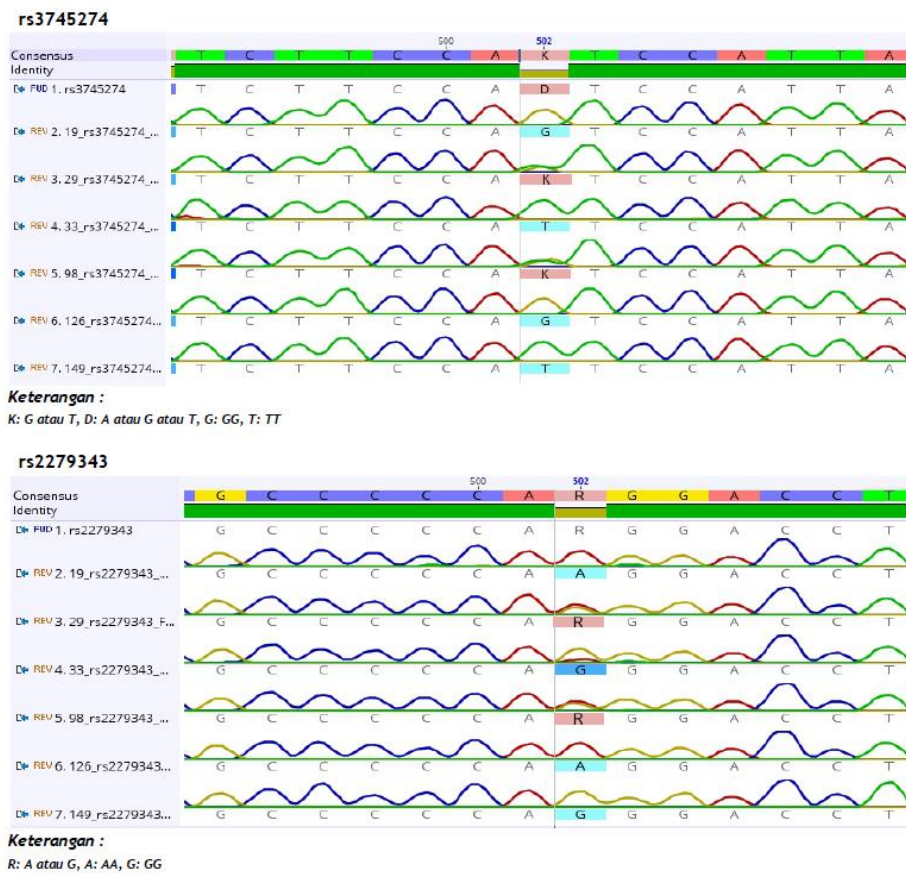
Gambar 3.1. Gambaran Diskriminasi Alel Menggunakan Sinyal Fluoresensi dari TaqMan Probe



Gambar 3.2. Visualisasi Hasil PCR rs3745274

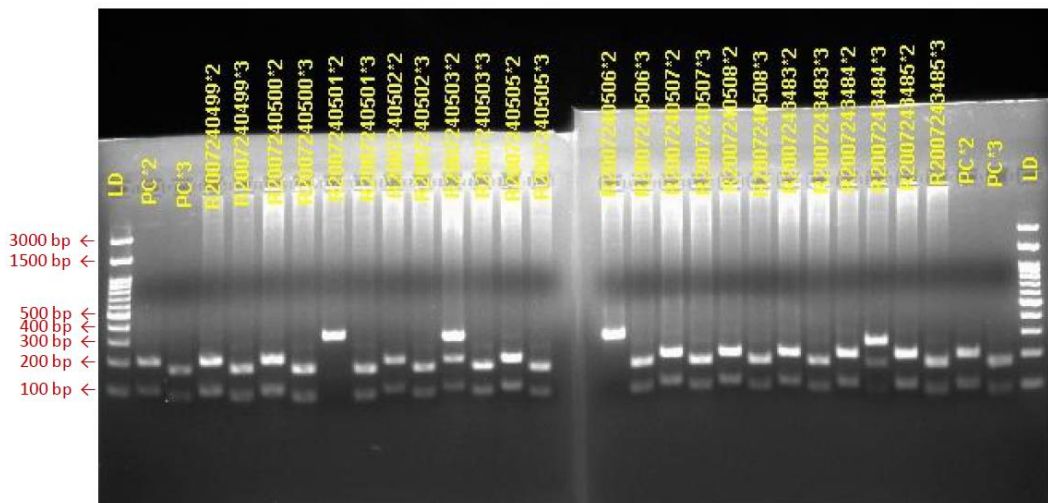


Gambar 3.3. Visualisasi Hasil PCR rs2279343



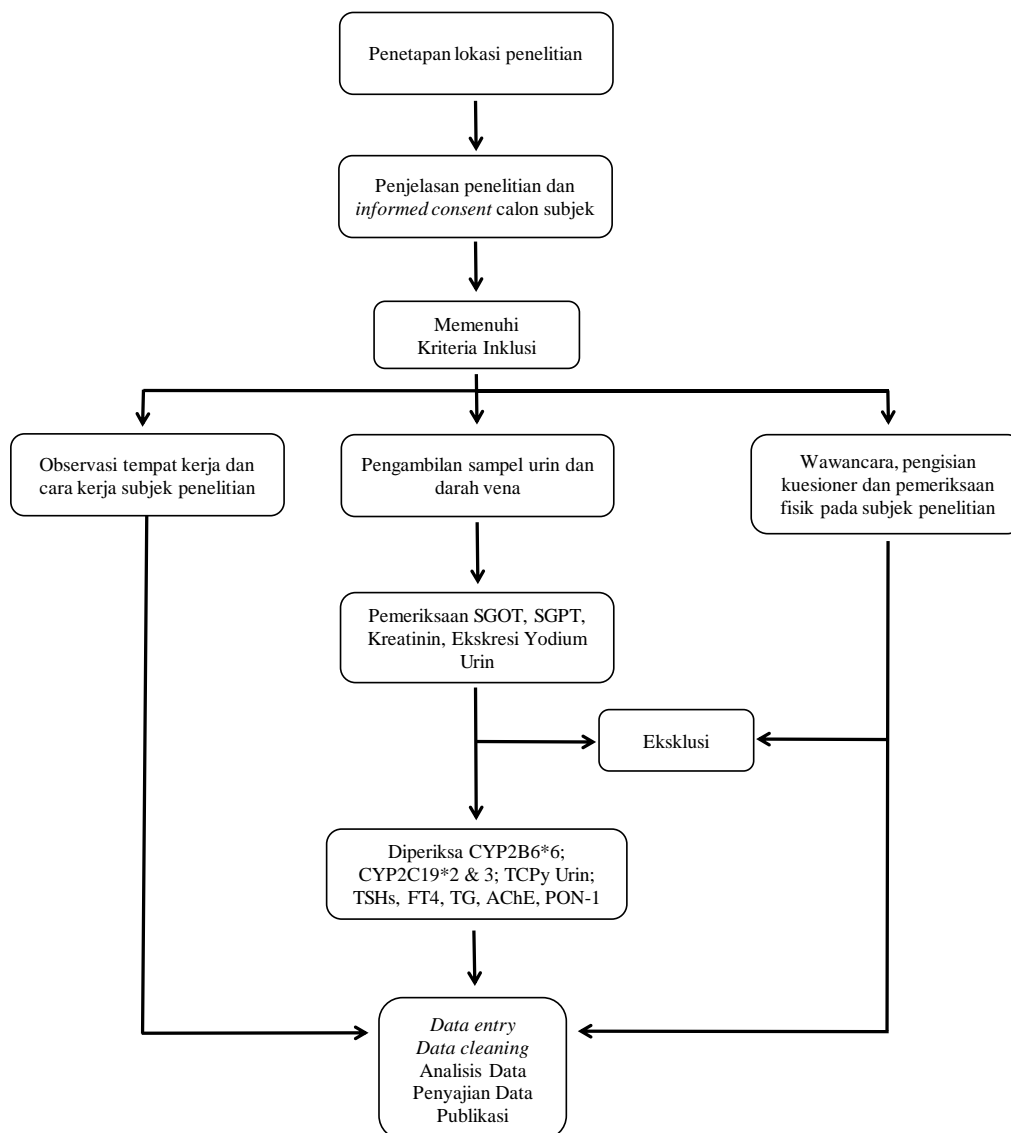
Gambar 3.4. Konfirmasi Sequencing Variasi genetik CYP2B6*6 (rs3745274 dan rs2279343)

Pemeriksaan CYP2C19 genotipe *2 dan *3 merupakan pemeriksaan genotipe menggunakan prinsip PCR-RFLP berdasarkan pada hilang atau munculnya suatu situs restriksi khusus akibat perubahan pada urutan DNA menggunakan sampel *whole blood*. Tahapan pemeriksaan dimulai dengan melakukan isolasi spesimen untuk mendapatkan asam nukleat, amplifikasi dan deteksi menggunakan gel agarose. Pada tahap RFLP, hasil PCR ditambahkan enzim restriksi/ endonuklease yang sesuai sehingga akan menghasilkan potongan/fragmen DNA dengan panjang berbeda, kemudian diidentifikasi menggunakan gel elektroforesis (Gambar 3.5.). Amplifikasi PCR untuk CYP2C19*2 menggunakan enzim restriksi SmaI, primer *forward* 5'-CAGAGCTTGGCATATTGTATC-3', dan primer *reverse* 5'-GTAAACACACA ACTAGTCAATG - 3'. Sementara pada *3 menggunakan primer *forward* 5'-AAATTGTTTCCAATCATTAGCT-3', *reverse* 5'-ACTTCAGGGCTTGGTCAATA-3' dan enzim restriksi BamHI.



Gambar 3.5. Visualisasi Hasil RFLP CYP2C19

3.4 Alur Penelitian



Gambar 3.6. Alur Penelitian

3.5 Identifikasi variabel

3.5.1 Variabel Terikat

- TSH (numerik)
- FT4 (numerik)
- Tiroglobulin (numerik)
- Rasio tiroglobulin/FT4

3.5.2 Variabel Bebas

- Usia (numerik)
- Jenis kelamin (kategorik / Dikotom)

- Indeks Massa Tubuh (numerik)
- Tekanan Darah (kategorik / ordinal)
- Tingkat Pendidikan (kategorik / ordinal)
- Kebiasaan merokok (kategorik / nominal)
- Ekskresi yodium urin (numerik)
- Polimorfisme gen CYP2B6*6 (kategorik / ordinal)
- Polimorfisme gen CYP2C19 (kategorik / ordinal)
- TCPy (numerik)
- Paraoksonase-1 / PON-1 (numerik)
- Aktivitas asetilkolinesterase eritrosit / (RBC AChE (numerik)
- *Intensity level* (numerik)
- Durasi kerja (numerik)
- Frekuensi kerja (numerik)
- Dosis pajanan kumulatif (kategorik / dikotom)
- Luas lahan olahan (numerik)
- Waktu aplikasi pestisida (kategorik / dikotom)
- Jenis pesisida yang digunakan (kategorik / dikotom)
- Volume campuran pestisida (numerik)
- Hari setelah aplikasi (numerik)
- Pestisida lambat terurai (kategorik / dikotom)

3.6 Pengolahan dan Analisis Data

Data yang dikumpulkan diolah sebagai berikut:

1. Setelah data dikumpulkan, dilakukan verifikasi data pertama yaitu memeriksa kelengkapan data yang ada antara lain lembar pemeriksaan fisik dan kuesioner serta hasil pemeriksaan laboratorium.
2. *Data entry*. Map berisi set kuesioner dan set pemeriksaan fisik subjek penelitian dibuka dan dipindahkan ke file excel. Demikian halnya dengan hasil pemeriksaan laboratorium dan pemeriksaan genetik.
3. *Data cleaning*. Setelah seluruh map subjek penelitian selesai dipindahkan ke file excel, sebagai verifikasi kedua dilakukan pengecekan terhadap kesesuaian pengisiannya secara terstruktur dengan mencari data *missing* dan pengurutan

data. Telah dilakukan koreksi terhadap data yang kurang akurat, tidak lengkap, atau memiliki format yang salah dalam basis data. Data yang telah dibersihkan ditetapkan sebagai data dasar yang dianalisis.

4. Dilakukan pengkodean data terhadap variabel-variabel yang dianalisis sesuai dengan klasifikasi dalam definisi operasional.
5. Analisis data di bawah ini dilakukan dengan program SPSS versi 20.

Analisis deskriptif. Data dianalisis untuk disajikan dalam tabel distribusi frekuensi dan persentase untuk data kategorik. Pada data numerik ditampilkan nilai rerata, median dan simpang baku (min-maks) sehingga terlihat gambaran deskriptif semua variabel yang diteliti.

Uji normalitas. Pada variabel berskala numerik dilakukan uji normalitas dengan menghitung *coefficient of variance* (CoV) dan uji Kolmogorov-Smirnov (KS). Data dikatakan berdistribusi normal bila $CoV < 20\%$ dan KS dengan nilai $p > 0,05$.

Analisis bivariat. Hubungan antara 2 variabel kategorik dianalisis dengan uji *Chi-Square*, bila syarat uji tersebut tidak terpenuhi maka akan digunakan uji Fischer's Exact. Uji Mann-Whitney U dan Kruskal Wallis dilakukan untuk menguji perbedaan variabel berskala numerik berdasarkan karakteristik individu dan okupasi. Frekuensi alel dan genotip diperhitungkan secara langsung. Tingkat kepercayaan yang digunakan 95% dan nilai $p \leq 0,05$.

Analisis multivariat. Untuk mengetahui hubungan faktor risiko yang dominan berkontribusi terhadap fungsi tiroid secara bersamaan dilakukan analisis multivariat dengan regresi linier ganda. Faktor-faktor risiko yang diikutsertakan dalam analisis ini adalah yang memiliki nilai $p \leq 0,20$ pada analisis regresi linier sederhana. Faktor yang berkontribusi pada tingkat kemaknaan 0,05 dipertahankan dalam model final yang diperoleh melalui analisis berdasarkan prosedur *stepwise*.

6. Analisis jalur (*Path analysis*) dilakukan dengan program JASP versi 0.14.1 (*University of Amsterdam*) untuk menguji model hubungan kausalitas faktor-faktor yang berkontribusi terhadap TSH. Penggunaan aplikasi JASP ini sebagai substitusi analisis jalur dengan SPSS yang hanya dapat dilakukan dengan bantuan program tambahan Amos.

7. Data yang telah dianalisis disajikan dalam bentuk tekstular, tabular dan grafikal sebagai laporan penelitian dan siap dipublikasikan. Satu laporan penelitian telah terpublikasi (lampiran 21) sementara dua (2) laporan lainnya pada lampiran 22 dan 23 dalam persiapan untuk publikasi di jurnal ilmiah.

3.7 Definisi Operasional

1. Disrupsi tiroid: gangguan pada fungsi kelenjar tiroid yang dinilai dengan konsentrasi TSH, FT4, dan tiroglobulin.
2. Rasio Tg/FT4: adalah perbandingan kadar tiroglobulin dengan kadar FT4.
Jenis data numerik berskala ukur rasio.
3. Tingkat Pendidikan: adalah jenjang pendidikan formal terakhir yang telah diselesaikan subjek penelitian hingga pada waktu pengumpulan data penelitian ini dilakukan. Metode pengumpulan data melalui wawancara terstruktur dengan menggunakan kuesioner.
Kategori: Pendidikan rendah (tidak menyelesaikan wajib belajar 12 tahun) dan pendidikan tinggi (menyelesaikan wajib belajar 12 tahun atau menempuh pendidikan lebih tinggi)
Jenis data kategorik berskala ukur nominal.
4. Ekskresi yodium urin: adalah kadar yodium subjek penelitian dalam urin sewaktu diukur dengan menggunakan ICP-MS dan dinyatakan dalam satuan $\mu\text{g/L}$.
Jenis data numerik berskala ukur rasio.
5. Polimorfisme CYP2B6: adalah genotip CYP2B6 yang diketahui dengan memeriksa DNA dari sampel darah subjek penelitian menggunakan metode *polymerase chain reaction* (PCR) – TaqMan dan sekuensing Sanger.
Kategori: CYP2B6*1/*1, CYP2B6*1/*6, CYP2B6*6/*6
Jenis data kategorik berskala ukur ordinal.
6. Polimorfisme CYP2C19: adalah genotip CYP2C19 yang diketahui dengan memeriksa DNA dari sampel darah subjek penelitian menggunakan metode PCR-RFLP.
Kategori: CYP2C19*1/*1, CYP2C19*1/*2, CYP2C19*1/*3, CYP2C19*2/*2
Jenis data kategorik berskala ukur ordinal.

7. TCPy: adalah kadar 3,5,6-trikloro-2-piridinol dalam spesimen urin mid-stream pertama pagi hari subjek penelitian yang diukur dengan menggunakan LC-MSMS dan dinyatakan dalam satuan $\mu\text{g}/\text{gram}$ kreatinin.
Jenis data numerik berskala ukur rasio.
8. Paraoksonase-1: adalah kadar enzim paraoksonase dalam serum subjek penelitian yang diukur dengan menggunakan spektrofotometri dan dinyatakan dengan satuan mol/L.
Jenis data numerik berskala ukur rasio.
9. Asetilkolinesterase eritrosit (RBC-AChE): adalah aktivitas enzim AChE dalam sel darah merah subjek penelitian yang diukur dengan menggunakan spektrofotometri dan dinyatakan dengan satuan U/g hematokrit.
Jenis data numerik berskala ukur rasio.
10. *Intensity level* (dosis pajanan harian): adalah dosis harian pajanan pestisida yang diterima oleh pekerja yang diketahui dengan memperhitungkan peran 10 faktor karakteristik pekerjaannya yaitu kegiatan mencampur pestisida (*mix*), metode dalam mencampur pestisida (*enclosed*), metode pengaplikasian pestisida (*appl*), penggunaan kendaraan tertutup (*cab*), perbaikan peralatan penyemprotan (*repair*), pencucian peralatan penyemprotan (*wash*), penggunaan alat pelindung diri (*PPE*), penggantian sarung tangan (*repl*), higiene individu (*hyg*), dan penanganan tumpahan/percikan pestisida (*spill*). Metode pengumpulan data melalui wawancara terstruktur menggunakan kuesioner dan pengamatan langsung.
Jenis data numerik berskala ukur rasio.
11. Pengalaman usaha tani: adalah jumlah tahun bekerja melakukan aktivitas pengaplikasian pestisida. Metode pengumpulan data melalui wawancara terstruktur dengan menggunakan kuesioner.
Jenis data numerik berskala ukur rasio.
12. Jumlah hari aplikasi per tahun: adalah jumlah hari kerja per tahun untuk melakukan aktivitas pengaplikasian pestisida.
Jenis data numerik berskala ukur rasio.
13. Dosis pajanan kumulatif: Besarnya dosis pajanan pestisida yang diterima oleh pekerja dengan karakteristik kerja tertentu dalam sebuah periode waktu. Dosis

pajanan kumulatif didapatkan melalui hasil perkalian antara dosis pajanan harian dengan durasi dan frekuensi kerja.

Kategori: tinggi, rendah

Jenis data kategorik berskala ukur nominal.

14. Luas lahan olahan: adalah luas keseluruhan lahan pertanian yang diolah oleh petani dalam satuan hektar.

Jenis data numerik berskala ukur rasio.

15. Waktu aplikasi pestisida: adalah pemilihan waktu untuk menyemprot pestisida di lahan pertanian.

Kategori: selalu pada pagi hari, pada waktu selain pagi hari

Jenis data kategorik berskala ukur nominal.

16. Jenis pestisida yang digunakan: adalah banyaknya jenis pestisida yang dipergunakan sebagai campuran dalam aktivitas penyemprotan di lahan pertanian oleh subjek penelitian.

Kategori: > 3 pestisida dan ≤ 3 pestisida

Jenis data kategorik berskala ukur nominal.

17. Volume campuran pestisida: adalah rerata volume campuran pestisida harian yang digunakan dalam aktivitas penyemprotan di lahan pertanian oleh subjek penelitian, dinyatakan dalam satuan liter per hari.

Jenis data numerik berskala ukur rasio.

18. Penggunaan pestisida yang lambat terurai adalah penggunaan jenis pestisida tambahan yang lambat terurai oleh petani.

Kategori: Menggunakan dan tidak menggunakan

Jenis data kategorik berskala ukur nominal.

19. Hari setelah aplikasi: adalah selisih waktu antara pengambilan spesimen darah dan urin pada sesi pemeriksaan kedua dengan hari terakhir melakukan penyemprotan pestisida, dinyatakan dalam satuan hari.

Jenis data numerik berskala ukur rasio.

3.8 Etika Penelitian

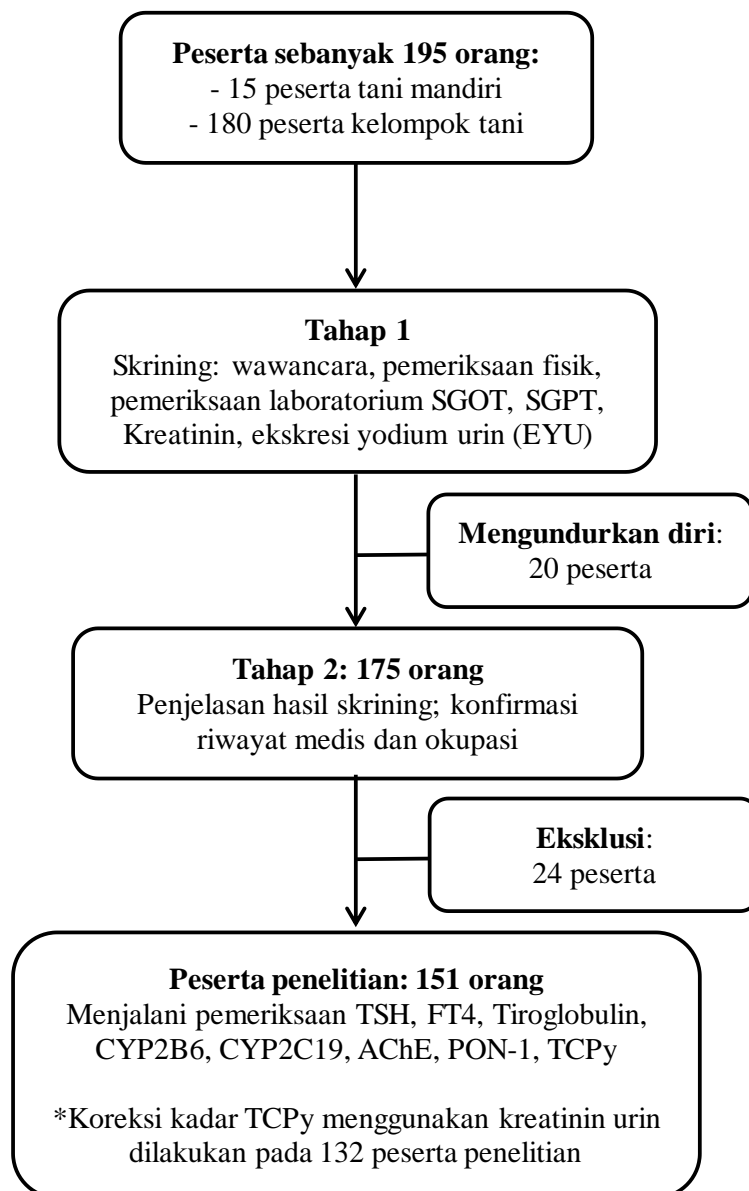
Penelitian ini menerapkan prinsip etik penelitian kedokteran pada subjek manusia sesuai Deklarasi Helsinki yaitu *respect for person*, *beneficence*, *non-maleficence*, berkeadilan, jujur dan menjaga kerahasiaan subjek. Komisi Etik Penelitian Fakultas

Kedokteran Universitas Indonesia dan RSUPN Dr. Cipto Mangunkusumo menyetujui dengan penerbitan **Surat Keterangan Lolos Kaji Etik No. KET-339/UN2.F1/ETIK/PPM.00.02/2020 tanggal 23 Maret 2020** dan **Amandemen protokol penelitian nomor ND-997/UN2.F1/ETIK/PPM.00.02/2020 tanggal 31 Agustus 2020**. Seluruh subjek yang berpartisipasi dalam penelitian telah memperoleh penjelasan mengenai penelitian ini (lampiran 1) dan berhak untuk berpartisipasi secara penuh maupun tidak berpartisipasi tanpa paksaan ataupun tekanan apapun. Persetujuan untuk berpartisipasi dituangkan dengan menandatangani lembar persetujuan setelah memperoleh penjelasan tentang penelitian (*informed consent*) pada lampiran 2. Semua data dan hasil penelitian dijaga kerahasiaannya.

BAB 4 HASIL PENELITIAN

4.1 Alur Rekrutmen Subjek Penelitian

Populasi penelitian pada Dusun Pancot dan Desa Adipuro yaitu sekitar 300 dan 400 orang, yang keseluruhannya merupakan anggota kelompok tani. Alur rekrutmen subjek penelitian disajikan dalam Gambar 4.1. di bawah ini.



Gambar 4.1. Alur Rekrutmen Subjek Penelitian

Seluruh subjek yang memenuhi syarat dan bersedia berpartisipasi dalam penelitian ini dengan menandatangani *informed consent* terdiri dari 180 orang anggota

kelompok tani dan 15 orang peserta tani mandiri diikutsertakan sebagai subjek penelitian. Subjek yang tidak hadir di tahap 2 untuk sesi memperoleh penjelasan hasil skrining dianggap mengundurkan diri. Sebanyak 15 subjek dengan hasil pemeriksaan ekskresi yodium urin (EYU) $< 50 \mu\text{g/L}$, 7 subjek yang memutuskan tidak ingin melanjutkan pemeriksaan, 1 subjek dengan dugaan gangguan ginjal dan 1 subjek yang tidak melengkapi konfirmasi atas riwayat medis dan okupasinya tidak diikutsertakan pada pemeriksaan lanjutan. Pemeriksaan TCPy urin dilakukan terhadap 151 spesimen, namun karena keterbatasan jumlah urin yang tersedia dari masing-masing subjek, TCPy yang dikoreksi dengan kreatinin urin hanya dapat dilakukan pada 132 subjek.

4.2 Karakteristik Subjek Penelitian

4.2.1 Karakteristik Umum

Subjek penelitian berusia 50 (Simpang baku - SB 9,4) tahun, 91% laki-laki, 93% merupakan anggota kelompok tani dan 87% berpendidikan rendah (tidak menyelesaikan wajib belajar 12 tahun) dengan 10 subjek di antaranya tidak pernah menjalani pendidikan formal. Proporsi perokok pada subjek penelitian sebesar 48%. Masing-masing 4 orang subjek belum menikah dan berstatus janda/duda. Kedua kelompok ini digabungkan ke kategori tidak menikah dalam karakteristik sosiodemografi. Lebih dari 93% subjek memiliki lahan dan mengolah sendiri lahan tersebut, 5% subjek mengolah lahan sendiri dan mengerjakan lahan milik orang lain, selebihnya hanya mengerjakan lahan milik orang lain. Karakteristik subjek penelitian dijabarkan di Tabel 4.1.

4.2.2 Karakteristik Kegiatan Terpajan Pestisida

Seluruh subjek penelitian menggunakan CPF berupa cairan, aplikasi pestisida dilakukan melalui penyemprotan. Tidak ada subjek yang menggunakan pestisida di luar aktivitas pertanian, juga tidak ada yang terpajan obat serangga untuk penggunaan di rumah tangga. Selain itu, terdapat sejumlah kondisi yang serupa di antara subjek penelitian dalam hal pajanan selama kegiatan penyemprotan pestisida pada tanaman. Aktivitas persiapan, pencampuran, pemuatan, dan penyemprotan pestisida menggunakan tangki semprot (*knapsack sprayer*) dilakukan secara pribadi oleh masing-masing subjek pada area terbuka. Karakteristik kegiatan terpajan

pestisida pada subjek penelitian digambarkan pada Tabel 4.2. Rerata (SB) dan median (minimum-maksimum) dosis pajanan kumulatif (DPK) pada subjek penelitian berturut-turut adalah 32,44 (SB 24,78) dan 25,95 (0,40–136,58) yang diperoleh dari estimasi berdasarkan hasil perkalian antara *intensity level* (IL), pengalaman usaha tani dan jumlah hari aplikasi per tahun. Subjek diklasifikasikan menjadi kelompok DPK tinggi dan rendah berdasarkan titik potong nilai median tersebut.

Tabel 4.1. Karakteristik Sosiodemografi, Kebiasaan dan Keadaan Fisik Umum

Karakteristik	Frekuensi n (%)	Rerata (SB)
Sosiodemografi		
Umur		49,97 (9,41)
Jenis kelamin		
Perempuan	14 (9,3)	
Laki-laki	137 (90,7)	
Kepesertaan di kelompok tani (poktan)		
Mandiri (non-poktan)	11 (7,3)	
Tergabung poktan	140 (92,7)	
Pendidikan Terakhir		
Pendidikan rendah	131 (86,8)	
Pendidikan tinggi	20 (13,2)	
Status Pernikahan		
Menikah	143 (94,7)	
Tidak menikah	8 (5,3)	
Kebiasaan dan Keadaan Fisik Umum		
Kebiasaan merokok		
Merokok	73 (48,3)	
Tidak merokok	78 (51,7)	
Status Gizi (Indeks massa tubuh)		
Obesitas	30 (19,9)	
Berat badan lebih	32 (21,2)	
Berat badan kurang	6 (4,0)	
Normal	83 (55,0)	
Tekanan Darah		
$\geq 160/100$ mmHg	21 (13,9)	
$140/90 < 160/100$ mmHg	50 (33,1)	
$120/80 < 140/90$ mmHg	59 (39,1)	
$< 120/80$ mmHg	21 (13,9)	

Tabel 4.2. Karakteristik Kegiatan Terpapar Pestisida Berdasarkan Dosis Paparan Kumulatif

Karakteristik Kegiatan Terpapar Pestisida	Dosis Paparan Kumulatif – (n %)			p ^{mw}
	Gabungan (n = 151)	Tinggi (n = 71)	Rendah (n = 80)	
Luas lahan olahan (hektar)*	0,20 (0,01–0,70)	0,25 (0,03–0,70)	0,15 (0,01–0,50)	0,001
Jumlah lahan yang diolah*	3 (1–13)	4 (1–13)	3 (1–9)	0,021
Total jenis pestisida yang digunakan*	3 (1–6)	3 (1–6)	3 (1–6)	0,014
Pengalaman usaha tani (tahun)*	25 (1–45)	30 (7–45)	25 (1–40)	<0,001
Durasi kerja harian (jam)*	6 (3–10)	7 (3–10)	6 (4–10)	0,005
Durasi paparan harian (jam)*	0,43 (0,04–2,25)	0,57 (0,14–2,00)	0,30 (0,04–2,25)	<0,001
Volume campuran yang disemprot (L/hr)*	19,2 (2,3–85,0)	27,2 (7,0–81,6)	14,6 (2,3–85,0)	<0,001
Jumlah hari aplikasi per tahun*	104 (37–364)	104 (52–364)	73 (37–364)	<0,001
Intensity level*	11,52 (1,00–23,04)	14,26 (7,52–21,89)	10,37 (1,00–23,04)	<0,001
Takaran penggunaan				
Tidak sesuai petunjuk	148 (98,0)	71 (100)	77 (96,2)	0,248 [#]
Sesuai petunjuk	3 (2,0)	0 (0)	3 (3,8)	
Waktu aplikasi				
Selain pagi hari	60 (39,7)	23 (32,4)	37 (46,2)	0,082 ^{cs}
Pagi hari	91 (60,3)	48 (67,6)	43 (53,8)	
Jumlah campuran pestisida				
> 3 jenis	44 (29,1)	15 (21,1)	29 (36,2)	0,041 ^{cs}
≤ 3 jenis	107 (70,9)	56 (78,9)	51 (63,8)	
Alat aplikasi				
Engkol (Manual)	35 (23,2)	13 (18,3)	22 (27,5)	0,182 ^{cs}
Batere / motor	116 (76,8)	58 (81,7)	58 (72,5)	

* Median (minimum–maksimum)

mw: Mann-Whitney U test; cs=Chi-square; [#]Fisher's exact

Hanya ditemukan 2% petani yang menggunakan pestisida sesuai dengan petunjuk penggunaannya dan semuanya termasuk dalam kelompok DPK rendah. Seperti yang ditunjukkan pada Tabel 4.2. kelompok DPK tinggi memiliki karakteristik lahan olahan yang lebih luas, waktu kerja harian yang lebih panjang, durasi penyemprotan pestisida yang lebih lama, dan volume campuran pestisida yang digunakan lebih tinggi daripada kelompok DPK rendah. Di sisi lain, proporsi petani yang mencampur lebih dari tiga jenis pestisida lebih tinggi pada kelompok DPK rendah. Rerata hari penyemprotan per tahun pada populasi penelitian cukup tinggi dan mencapai lebih dari 100 hari per tahun.

Tabel 4.3. Karakteristik Kebiasaan Penggunaan APD

Jenis APD	Penggunaan APD	
	Jarang/tidak pernah n (%)	Sering/selalu n (%)
Apron	149 (98,7)	2 (1,3)
Masker	79 (52,3)	72 (47,7)
Penutup wajah	143 (94,7)	8 (5,3)
Respirator	151 (100)	0 (0)
Goggle	150 (99,3)	1 (0,7)
Pakaian lengan panjang	15 (9,9)	136 (90,1)
Celana panjang	14 (9,3)	137 (90,7)
<i>Coverall</i>	151 (100)	0 (0)
Sarung tangan kimia	147 (97,4)	4 (2,6)
Sepatu bot	63 (41,7)	88 (58,3)

Tidak ada subjek yang mengenakan respirator, *coverall*, atau pakaian kerja sekali pakai. Proporsi pengguna kacamata dan sarung tangan kimia dalam populasi penelitian ini juga sangat kecil yang terlihat pada kebiasaan penggunaan APD oleh subjek di Tabel 4.3. Akan tetapi, sebagian besar dari mereka sering menggunakan baju lengan panjang atau celana panjang saat bekerja di ladang. Empat orang subjek yang menggunakan sarung tangan kimia dalam sebagian besar aktivitas terpajan pestisida melaporkan bahwa sarung tangan hanya diganti ketika rusak dan seringkali tetap menggunakan sarung tangan yang sudah rusak.

Tabel 4.4. Proporsi Penggunaan Pestisida Pertanian Selain Klorpirifos

Golongan	Bahan aktif	Fungsi	Kelas	Frekuensi n (%)	Frekuensi n (%)
Karbamat					103 (68,2)
	Mankozeb	Fungisida	U	87 (57,6)	
	Metomil	Insektisida	Ib	9 (6,0)	
	Propineb	Fungisida	U	6 (4,0)	
	Piraklostrobin	Fungisida	n/a	1 (0,7)	
Avermektin					74 (49,0)
	Abamektin	Insektisida	Ib	57 (37,7)	
	Emamektin	Insektisida	II	17 (11,3)	
Triazol	Difenokonazol	Fungisida	II	49 (32,5)	
Piretroid					30 (19,9)
	Lamda-sihalotrin	Insektisida	II	13 (8,6)	
	Beta-siflutrin	Insektisida	Ib	10 (6,6)	
	Deltametrin	Insektisida	II	4 (2,6)	
	Sipermetrin	Insektisida	II	3 (2,0)	
Organofosfat					13 (8,6)
	Dimetoat	Insektisida	II	6 (4,0)	
	Profenofos	Insektisida	II	4 (2,6)	
	Asefat	Insektisida	II	2 (1,3)	
	Poksim	Insektisida	II	1 (0,7)	
Pirol	Klorfenafir	Insektisida	II		12 (7,9)
Benzamida	Lufenuron [#]	Insektisida	III		9 (6,0)
Spinosin	Spinetoram [§]	Insektisida	U		1 (0,7)
Thiosultap	Dimehipo	Insektisida	n/a		1 (0,7)
Kloronitril	Klorotalonil	Fungisida	U		1 (0,7)
Neonikotinoid [¶]	Imidakloprid	Insektisida	II		6 (4,0)
Fenilpirazol [¶]	Fipronil	Insektisida	II		6 (4,0)
Diamida [¶]	Klorantraniliprol	Insektisida	U		3 (2,0)
Benzohidrazid [¶]	Metoksifenosid [§]	Insektisida	U		1 (0,7)
Fenilamida [¶]	Mefenoksam	Fungisida	n/a		1 (0,7)

[#] Produk mengandung kombinasi Lufenuron + Emamektin

[§] Produk mengandung kombinasi Metoksifensid + Spinetoram

[¶] Kelas pestisida yang tergolong lebih lambat terurai

Kelas: Klasifikasi WHO (*Ib – highly hazardous; II – moderately hazardous; III – slightly hazardous; U – unlikely to present acute hazard; n/a – informasi tidak tersedia*)

Tabel 4.5. Distribusi Frekuensi Penggunaan Pestisida Gabungan

Kombinasi pestisida	Frekuensi n (%)	Frekuensi n (%)
Hanya CPF		9 (6,0)
Kombinasi Kelas IB		68 (45,0)
CPF + Kelas IB	7 (4,6)	
CPF + Kelas IB + Karbamat	21 (13,9)	
CPF + Kelas IB + Karbamat + Difenokonazol	16 (10,6)	
CPF + Kelas IB + Karbamat + Piretroid	6 (4,0)	
CPF + Kelas IB + Difenokonazol	13 (8,6)	
CPF + Kelas IB + Piretroid	4 (2,6)	
CPF + Kelas IB + Difenokonazol + Piretroid	1 (0,7)	
Kombinasi Karbamat		55 (36,4)
CPF + Karbamat	37 (24,5)	
CPF + Karbamat + Difenokonazol	11 (7,3)	
CPF + Karbamat + Piretroid	7 (4,6)	
Kombinasi non Kelas 1B dan Karbamat		19 (12,6)
CPF + Difenokonazol	5 (3,3)	
CPF + Difenokonazol + Piretroid	1 (0,7)	
CPF + Piretroid	9 (6,0)	
CPF + Pestisida lainnya	4 (2,6)	

Semua CPF yang digunakan merupakan sediaan cair, sama halnya dengan hampir 2 dari 3 pestisida tambahan yang digunakan juga berbentuk cair. *Ethylene-bis-dithiocarbamate (EBDC)* mankozeb dan abamektin adalah fungisida dan insektisida yang paling sering digunakan sebagai tambahan CPF pada subjek penelitian, seperti yang ditunjukkan pada Tabel 4.4. Hanya 5,9% petani yang menggunakan CPF sebagai pestisida tunggal sedangkan 27%, 38,2%, dan 28,9% lainnya berturut-turut menggunakan 2, 3, dan lebih dari 3 campuran pestisida. Terdapat 5 jenis pestisida tambahan yang dipergunakan oleh 16 orang (10,6%) subjek tergolong sebagai pestisida dengan waktu penguraian pada tanah yang lebih panjang. Tabel 4.5. menampilkan distribusi kombinasi CPF dengan pestisida lain. Tiga jenis insektisida tambahan yang dipergunakan oleh 68 orang (45%) subjek merupakan pestisida kelas Ib (sangat berbahaya) menurut klasifikasi WHO, namun dari jumlah itu sebanyak 61 subjek ternyata juga menambahkan pestisida karbamat atau difenokonazol atau piretroid atau pestisida lainnya. Sejumlah besar subjek dalam Tabel 4.6. melaporkan kebiasaan kerja yang baik dalam hubungannya

dengan praktik kebersihan diri dan penanganan dalam kontak langsung terhadap pestisida yaitu melalui tindakan cuci tangan, mandi dengan benar dan mengganti pakaian setelah penyemprotan atau setelah berkontak dengan pestisida. Sebanyak 73% subjek melaporkan mengalami kontak langsung dengan produk pestisida, dan lebih dari 80% telah melaporkan terciprat atau terkena tumpahan pestisida selama aktivitas persiapan atau penyemprotan.

Tabel 4.6. Karakteristik Kebiasaan Selama Bekerja

Kebiasaan kerja	Frekuensi - n (%)	
	Sering / selalu	Jarang / tidak pernah
Mengelap keringat	29 (19,2)	122 (80,8)
Memasuki lahan setelah semprot	33 (21,9)	118 (78,1)
Semprot lawan arah angin	1 (0,7)	150 (99,3)
Menggunakan alat semprot rusak	0 (0)	151 (100)
Kena percikan saat aplikasi	132 (87,4)	19 (12,6)
Kena percikan saat menuang	123 (81,5)	28 (18,5)
Menyentuh langsung pestisida	110 (72,8)	41 (27,2)
Makan di tengah waktu kerja	5 (3,3)	146 (96,7)
Cuci tangan setelah kontak pestisida	151 (100)	0 (0)
Cuci tangan sebelum makan	151 (100)	0 (0)
Mandi setelah semprot	139 (92,1)	12 (7,9)
Ganti baju setelah semprot	144 (95,4)	7 (4,6)

Tabel 4.7. Analisis Regresi Linier Ganda antara Variabel yang Berkontribusi terhadap Dosis Paparan Kumulatif

Kontributor	B	SE (B)	Beta	IK 95%	p
Umur	0,85	0,17	0,32	0,51 ; 1,19	< 0,001
Luas total lahan	57,32	16,18	0,30	25,35 ; 89,30	0,001
Volume campuran	0,33	0,11	0,25	0,11 ; 0,55	0,004
Baju lengan panjang	-18,08	5,69	-0,22	-29,33 ; -6,84	0,002
Celana panjang	-12,40	5,84	-0,15	-23,94 ; -0,86	0,035

B = *Parameter estimate*; SE (B) = Standar eror untuk B

$R^2 = 0,38$; R^2 suaiian = 0,36

Umur dalam tahun (numerik)

Luas total lahan dalam hektar (numerik)

Volume campuran dalam liter (numerik)

Baju lengan panjang / celana panjang: 0=tidak pernah/jarang (referensi), 1=sering/selalu

Tabel 4.7. menunjukkan hasil analisis regresi linier ganda antara DPK dengan faktor yang berkontribusi. Menggunakan pakaian berlengan panjang dan celana

panjang saat menyemprotkan pestisida berhubungan dengan pajanan kumulatif yang lebih rendah sementara volume campuran yang lebih tinggi dan lahan yang lebih luas dikaitkan dengan DPK kumulatif yang lebih tinggi.

4.2.3 Variasi Genetik Subjek Penelitian

Frekuensi genotip CYP2B6*6 sebagai kombinasi alel CYP2B6 785A>G & 516G>T dan frekuensi genotip CYP2C19 disajikan pada Tabel 4.8. Distribusi genotip keduanya berdasarkan kelompok DPK ditampilkan pada Tabel 4.9. Frekuensi genotip CYP2B6*6, CYP2C19*2 dan *3 berada dalam kesetimbangan Hardy-Weinberg.

Tabel 4.8. Distribusi Genotip CYP2B6 dan CYP2C19 Berdasarkan Jenis Kelamin

Genotip	Jenis kelamin [#]			p ^{cs}
	Gabungan (n = 151)	Perempuan (n = 14)	Laki-laki (n = 137)	
CYP2B6 (785A>G & 516G>T)				
*1/*1	48 (31,8)	5 (35,7)	43 (31,4)	0,866
*1/*6	75 (49,7)	6 (42,9)	69 (50,4)	
*6/*6	28 (18,5)	3 (21,4)	25 (18,2)	
CYP2C19 (681 G>A & 636 G>A)				
AA (*2/*2)	9 (6,0)	0 (0)	9 (6,6)	0,559
GA (*1/*2)	35 (23,2)	5 (35,7)	30 (21,9)	
GA (*1/*3)	11 (7,3)	1 (7,1)	10 (7,3)	
GG (*1*1)	96 (63,6)	8 (57,1)	88 (64,2)	

[#] n (% dalam kelompok jenis kelamin); *cs=Chi-square*

Tabel 4.9. Distribusi Genotip CYP2B6 & CYP2C19 Berdasarkan Dosis Pajanan Kumulatif

Genotip	Dosis Pajanan Kumulatif [#]		p ^{cs}
	Tinggi (n = 71)	Rendah (n = 80)	
CYP2B6 (785A>G & 516G>T)			
*1/*1	24 (33,8)	24 (30,0)	0,317
*1/*6	31 (43,7)	44 (55,0)	
*6/*6	16 (22,5)	12 (15,0)	
CYP2C19 (681 G>A & 636 G>A)			
AA (*2/*2)	3 (4,2)	6 (7,5)	0,580
GA (*1/*2)	14 (19,7)	21 (26,2)	
GA (*1/*3)	6 (8,5)	5 (6,2)	
GG (*1*1)	48 (67,6)	48 (60,0)	

[#] n (%); *cs=Chi-square*

4.3 Pemeriksaan Markah Paparan Klorpirifos: PON-1, AChE dan TCPy

4.3.1 Hubungan Kegiatan Terpapar Pestisida terhadap Markah Paparan

Hasil pengukuran markah paparan CPF yaitu PON-1, aktivitas AChE eritrosit dan TCPy urin ditampilkan dalam Tabel 4.10. Karena keterbatasan jumlah sampel urin yang tersedia, hanya 132 subjek dengan hasil pemeriksaan TCPy yang dapat dikoreksi dengan kreatinin urin.

Tabel 4.10. Profil Markah Paparan Klorpirifos

Markah	Median (min-maks)
TCPy (ppb)	2,43 (0,32–26,55)
TCPy ($\mu\text{g/g}$ kreatinin); n=132	2,31 (0,17–49,12)
PON-1 (mol/L)	120,93 (49,55–196,57)
Aktivitas AChE (U/g Hematokrit)	8,03 (4,15–14,13)

Hubungan antara kadar markah paparan CPF dengan sejumlah faktor yang berkontribusi yaitu karakteristik individu dan kegiatan terpapar pestisida ditampilkan pada Tabel 4.11. dan Tabel 4.12. Kebiasaan merokok memengaruhi kadar TCPy dan aktivitas AChE. Waktu aplikasi pestisida, jumlah jenis pestisida yang digunakan dan sejumlah kebiasaan dalam kegiatan pengaplikasian pestisida, merupakan faktor okupasi yang secara bermakna terkait dengan kadar TCPy dan aktivitas AChE pada subjek. Tidak didapatkan perbedaan kadar PON-1 pada subjek penelitian berdasarkan faktor-faktor yang diuji.

Kadar AChE dianalisis terhadap sejumlah variabel kontributor menggunakan regresi linier sederhana seperti disajikan pada Tabel 4.13. Umur, kebiasaan merokok, kadar TCPy, hari setelah aplikasi, DPK, dan waktu aplikasi diikutsertakan ke dalam model analisis regresi linier ganda. Aktivitas AChE eritrosit pada subjek penelitian berhubungan dengan DPK, umur, kadar TCPy, dan lamanya hari setelah aplikasi. Subjek dengan DPK tinggi akan memiliki aktivitas AChE yang lebih rendah, sementara itu kadar TCPy yang lebih tinggi dan usia yang lebih tua berhubungan positif dengan AChE (Tabel 4.14).

Tabel 4.11. Profil Markah Paparan Klorpirifos Berdasarkan Karakteristik Individu

Karakteristik individu	n	PON-1*	p ^{mw}	AChE eritrosit*	p ^{mw}	n [#]	TCPy*	p ^{mw}
Jenis kelamin	Perempuan	14	112,53 (85,32–168,40)	0,878	7,71 (4,90–12,04)	13	2,08 (0,56–30,31)	0,601
	Laki-laki	137	121,15 (49,55–196,57)	0,082	8,18 (4,15–14,13)	119	2,35 (0,17–49,12)	< 0,001
Kebiasaan merokok	Merokok	73	113,55 (49,55–180,86)	0,429	7,55 (4,15–14,13)	65	1,63 (0,17–42,64)	0,008
	Tidak merokok	78	122,23 (50,60–196,57)	0,918	8,60 (4,83–13,28)	67	3,68 (0,39–49,12)	0,315
Pendidikan terakhir	Rendah	131	121,15 (49,55–196,57)	0,918	7,97 (4,15–14,13)	114	2,09 (0,39–49,12)	0,008
	Tinggi	20	117,08 (54,84–173,30)	0,918	8,98 (4,60–10,59)	18	4,99 (0,17–42,64)	0,315
Indeks massa tubuh	≥ 25 kg/m ²	30	114,72 (71,81–180,86)	0,918	7,74 (4,60–10,35)	26	1,89 (0,46–10,57)	0,315
	< 25 kg/m ²	121	121,15 (49,55–196,57)	0,918	8,18 (4,15–14,13)	106	2,54 (0,17–49,12)	0,315

* Median (minimum-maksimum);

n=132 untuk TCPy (µg/g kreatinin)

mw: *Mann-Whitney U test*

Tabel 4.12. Profil Markah Paparan Klorpirifos Berdasarkan Karakteristik Kegiatan Terpaparan Pestisida

Karakteristik kegiatan terpapar pestisida	n	PON-1*	p ^{mw}	AChE eritrosit*	p ^{mw}	n [#]	TCPy*	p ^{mw}
Alat semprot	35	129,61 (50,01–175,39)	0,905	8,50 (5,26–13,28)	0,013	30	2,34 (0,17–49,12)	0,942
Waktu aplikasi	116	119,37 (49,55–196,57)		7,92 (4,15–14,13)		102	2,31 (0,39–30,61)	
	60	120,51 (50,01–186,18)	0,846	8,98 (5,30–14,13)	< 0,001	47	4,97 (0,17–42,64)	< 0,001
	91	121,15 (49,55–196,57)		7,52 (4,15–13,28)		85	1,78 (0,39–49,12)	
Jumlah jenis pestisida yang digunakan	44	130,48 (50,01–196,57)	0,196	9,12 (4,95–11,95)	< 0,001	35	4,28 (0,17–42,64)	0,005
	107	118,52 (49,55–180,86)		7,48 (4,15–14,13)		97	1,79 (0,39–49,12)	
Mengelap keringat dengan baju kerja	29	132,61 (69,82–196,57)	0,112	9,22 (6,13–13,28)	< 0,001	20	4,42 (0,17–49,12)	0,129
Memasuki kembali area setelah semprot	122	119,14 (49,55–180,86)		7,65 (4,15–14,13)		112	2,22 (0,39–42,64)	
Terpercik saat menyemprot	33	125,28 (78,43–180,86)	0,311	6,99 (4,15–11,02)	0,013	32	1,69 (0,46–42,64)	0,025
	118	119,37 (49,55–196,57)		8,27 (4,60–14,13)		100	2,63 (0,17–49,12)	
Terpercik saat menuang	132	119,92 (49,55–196,57)	0,969	8,12 (4,15–14,13)	0,356	114	2,62 (0,17–49,12)	0,048
	19	123,31 (71,81–180,27)		7,81 (4,60–9,70)		18	1,56 (0,59–9,47)	
Terpercik saat mencuci	123	118,66 (49,55–196,57)	0,977	7,99 (4,15–14,13)	0,910	107	2,42 (0,17–49,12)	0,951
	28	127,41 (71,81–180,27)		8,23 (4,60–9,70)		25	2,12 (0,59–42,64)	
Kontak langsung dengan pestisida	110	120,08 (49,55–196,57)	0,968	7,97 (4,15–13,28)	0,338	95	2,35 (0,39–49,12)	0,897
Memakai baju lengan panjang	41	123,56 (71,81–186,18)		8,25 (5,26–14,13)		37	2,12 (0,17–42,64)	
Memakai celana panjang	15	118,66 (59,84–174,15)	0,542	8,20 (4,15–11,79)	0,943	13	1,63 (0,60–20,73)	0,434
	136	121,04 (49,55–196,57)		8,03 (4,60–14,13)		119	2,42 (0,17–49,12)	
Dosis paparan kumulatif	14	103,61 (50,01–174,15)	0,140	8,94 (4,95–11,95)	0,227	11	2,85 (0,46–20,73)	0,666
	137	123,31 (49,55–196,57)		7,99 (4,15–14,13)		121	2,26 (0,17–49,12)	
	71	114,53 (50,01–183,24)	0,299	7,55 (4,15–13,28)	0,001	63	2,63 (0,53–49,12)	0,343
	81	123,44 (49,55–196,57)		8,56 (4,60–14,13)		69	2,12 (0,17–42,64)	

* Median (minimum–maksimum);

n=132 untuk TCCPy (µg/g kreatinin)

mw: Mann-Whitney U test

Tabel 4.13. Analisis Regresi Linier Sederhana antara Variabel yang Berkontribusi terhadap AChE

Kontributor	B	SE (B)	Beta	IK 95%	p
Umur	0,07	0,02	0,32	0,04 ; 0,10	< 0,001
Sex	0,07	0,55	0,01	1,01 ; 1,15	0,897
IMT	-0,04	0,06	-0,06	-0,15 ; 0,07	0,441
Kebiasaan merokok	0,75	0,31	0,19	0,13 ; 1,36	0,018
TCPy	0,08	0,02	0,32	0,04 ; 0,12	< 0,001
Hari setelah aplikasi	-0,43	0,09	-0,38	-0,61 ; -0,26	< 0,001
DPK	1,06	0,31	0,27	0,45 ; 1,66	0,001
Waktu aplikasi	-1,24	0,31	-0,31	-1,85 ; -0,63	< 0,001

Tabel 4.14. Analisis Regresi Linier Ganda antara Variabel yang Berkontribusi terhadap AChE

Kontributor	B	SE (B)	Beta	IK 95%	p
Konstanta	4,58	0,86		2,89 ; 6,28	< 0,001
DPK	1,22	0,28	0,31	0,66 ; 1,79	< 0,001
Umur	0,06	0,02	0,30	0,03 ; 0,09	< 0,001
Hari setelah aplikasi	-0,30	0,08	-0,27	-0,46 ; -0,13	< 0,001
TCPy	0,06	0,02	0,24	0,02 ; 0,10	0,004

B = *Parameter estimate*; SE (B) = Standar error untuk B

$R^2 = 0,35$; R^2 suaian = 0,32

DPK: tinggi (referensi) atau rendah

Umur dalam tahun (numerik)

Hari setelah aplikasi (numerik)

TCPy urin dalam $\mu\text{g/g}$ kreatinin (numerik)

4.3.2 Hubungan Variasi Genetik CYP2B6, CYP2C19 dan Kegiatan Terpapar Pestisida terhadap Kadar TCPy

Variasi genetik pada CYP2B6 berhubungan dengan kadar TCPy dalam urin seperti yang ditampilkan dalam Tabel 4.15. Kadar TCPy tertinggi berada pada kelompok *1/*1 dan secara bermakna berbeda dengan kelompok *1/*6 maupun *6/*6. Analisis *post-hoc* menggunakan Mann-Whitney U antara *1/*1 dengan *1/*6 dan *6/*6 menunjukkan perbedaan berturut-turut pada $p = 0,039$ dan $p = 0,002$. Tabel 4.16. menampilkan hubungan antara konsentrasi TCPy dan faktor yang berkontribusi. Seluruh variabel yang berhubungan dengan kadar TCPy urin pada tingkat kemaknaan $p < 0,20$ dalam analisis regresi linier sederhana bersama dengan variabel CYP2C19 dan DPK diikutsertakan dalam analisis regresi linier ganda.

Tabel 4.15. Kadar TCPy Berdasarkan Variasi Genetik Subjek Penelitian

Variasi Genetik		n	TCPy*	p ^{kw}
CYP2B6	*1/*1	41	4,53 (0,39–49,12)	0,005
	*1/*6	67	2,21 (0,53–22,22)	
	*6/*6	24	1,66 (0,17–20,74)	
CYP2C19	*2/*2	8	2,15 (0,17–15,54)	0,466
	*1/*2	32	1,09 (0,53–22,22)	
	*1/*3	8	4,91 (1,34–30,61)	
	*1/*1	84	2,52 (0,39–49,12)	

* Median (minimum–maksimum) TCPy dalam $\mu\text{g/g}$ kreatinin

^{kw}: Kruskal Wallis

Tabel 4.16. Analisis Regresi Linier Sederhana antara Variabel yang Berkontribusi terhadap TCPy

Kontributor	B	SE (B)	Beta	IK 95%	p
Umur	0,13	0,07	0,16	-0,01 ; 0,26	0,073
Jenis kelamin	-1,76	2,24	-0,07	-6,19 ; 2,66	0,431
IMT	-0,57	0,22	-0,22	-1,02 ; -0,13	0,012
Kebiasaan merokok	3,36	1,30	0,22	0,78 ; 5,93	0,011
CYP2B6	-3,05	0,93	-0,28	-4,89 ; -1,21	0,001
CYP2C19	0,54	0,65	0,07	-0,75 ; 1,83	0,408
PON-1	0,03	0,02	0,13	-0,01 ; 0,07	0,130
Hari setelah aplikasi	-1,25	0,36	-0,29	-1,96 ; -0,54	< 0,001
DPK	-1,64	1,33	-0,11	-4,27 ; 0,99	0,220
Waktu aplikasi	-4,30	1,34	-0,27	-6,95 ; -1,64	0,002

Tabel 4.17. Analisis Regresi Linier Ganda antara Variabel yang Berkontribusi terhadap TCPy

Kontributor	B	SE (B)	Beta	IK 95%	p
Konstanta	22,61	4,82		13,08 ; 32,15	< 0,001
CYP2B6	-2,66	0,86	-0,24	-4,36 ; -0,95	0,002
Kebiasaan merokok	3,61	1,24	0,24	1,17 ; 6,05	0,004
IMT	-0,57	0,21	-0,22	-0,98 ; -0,16	0,006
DPK	-3,11	1,22	-0,21	-5,52 ; -0,70	0,012
Waktu aplikasi	-3,21	1,28	-0,20	-5,74 ; -0,67	0,014

B = *Parameter estimate*; SE (B) = Standar error untuk B

$R^2 = 0,24$; R^2 suaian = 0,21

CYP2B6*6: *1/*1 (referensi) atau *1/*6 atau *6/*6

Kebiasaan merokok: merokok (referensi) atau tidak merokok

Indeks massa tubuh dalam kg/m^2 (numerik)

DPK: tinggi (referensi) atau rendah

Waktu aplikasi: selain pagi hari (referensi) atau selalu pagi hari

Model akhir pada Tabel 4.17. memperlihatkan bahwa kadar TCPy yang lebih tinggi didapatkan pada subjek dengan genotipe CYP2B6*1/*1 ($p = 0,002$). Indeks massa tubuh ($p = 0,006$) berhubungan negatif dengan kadar TCPy sedangkan mereka yang diklasifikasikan sebagai tidak merokok ($p = 0,004$) atau tergabung pada kelompok DPK tinggi ($p = 0,012$) atau melakukan penyemprotan pada waktu selain pagi hari ($p = 0,014$) memiliki konsentrasi TCPy yang lebih tinggi.

4.4 Pemeriksaan Tiroid pada Penyemprot Pestisida Klorpirifos

Hasil pemeriksaan parameter laboratorium terkait tiroid yang terdiri atas TSH, FT4 dan tiroglobulin ditampilkan dalam Tabel 4.18. Konsentrasi ekskresi yodium urin di antara populasi penelitian ini berada pada tingkat yang memadai dengan median (minimum-maksimum) konsentrasi sebesar 173,5 (69,1–761,6) $\mu\text{g/L}$ dan hasil parameter tiroid ini secara umum masih berada dalam rentang normal pada nilai referensi alat. Rasio tiroglobulin terhadap FT4 merupakan hasil perhitungan langsung nilai tiroglobulin dikali 100, sebagai konversi satuan, dibagi dengan nilai FT4.

Tabel 4.18. Profil Parameter Pemeriksaan Tiroid

Pemeriksaan tiroid	Median (minimum-maksimum)
TSH (uIU/mL)	1,46 (0,01–10,30)
FT4 (ng/dL)	1,17 (0,79– 6,85)
Tiroglobulin (ng/mL)	7,87 (0,43–76,92)
Rasio Tg/FT4 ($\times 10^2$)	6,23 (0,37–91,57)

Tabel 4.19. menampilkan kros-tabulasi fungsi tiroid yang dikelompokkan berdasarkan DPK. Proporsi subjek dengan TSH, tiroglobulin, dan FT4 abnormal masing-masing adalah 3,9%, 17,2%, dan 9,3%. Semua subjek dengan TSH abnormal berada pada kelompok pajanan kumulatif tinggi. Proporsi subjek dengan FT4 yang abnormal sebesar 7.3%, terutama mereka memiliki konsentrasi FT4 rendah, namun proporsinya tidak berhubungan dengan DPK. Median rasio Tg/FT4 pada kelompok DPK tinggi lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok DPK rendah.

Tabel 4.19. Distribusi Frekuensi Abnormalitas TSH, FT4, Tiroglobulin, dan Median Rasio Tg/FT4 Berdasarkan Dosis Pajanan Kumulatif

DPK	TSH [†]		FT4		Tiroglobulin		Rasio Tg/FT4 (Median (min–maks))		
	Tinggi	Rendah	Tinggi	Rendah	Tinggi	Rendah			
Tinggi	4 (100,0)	2 (100,0)	3 (100,0)	5 (45,5)	63 (46,0)	0 (0,0)	6 (23,1)	65 (52,0)	7,34 (0,37–91,57)
Rendah	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	6 (54,5)	74 (54,0)	0 (0,0)	20 (76,9)	60 (48,0)	5,02 (0,50–27,13)
p ^{cs}	0,030		0,178		0,007		0,003 ^{mww}		

* *Chi-square*; ^{mww}: *Mann-Whitney U*

[†] p = 0,010 (*Fisher's exact*), mengindikasikan proporsi konsentrasi TSH abnormal (kombinasi tinggi dan rendah) yang lebih besar pada DPK tinggi
 Nilai referensi TSH: 0,27–4,2 mIU/L; FT4: 0,93–1,7 ng/dL; Tiroglobulin: 3,5–77 ng/mL

Tabel 4.20. Profil Parameter Pemeriksaan Tiroid Berdasarkan Karakteristik Individu

Karakteristik Individu	n	TSH*	p ^{mww}	FT4*	p ^{mww}	Tiroglobulin*	p ^{mww}	Rasio Tg/FT4*	p ^{mww}
Jenis kelamin	14	1,71 (0,70–4,36)	0,498	1,11 (0,86–1,24)	0,004	6,37 (0,57–27,51)	0,583	6,23 (0,50–23,31)	0,964
	137	1,38 (0,01–10,30)		1,18 (0,79–6,85)		7,95 (0,43–76,92)		6,22 (0,37–91,57)	
Kebiasaan merokok	73	1,37 (0,01–10,30)	0,978	1,27 (0,90–6,85)	<0,001	8,43 (1,61–46,95)	0,021	6,99 (1,19–26,68)	0,206
	78	1,52 (0,01–9,51)		1,13 (0,79–1,69)		6,08 (0,43–76,92)		5,40 (0,37–91,57)	
Pendidikan terakhir	131	1,30 (0,01–10,30)	0,826	1,17 (0,79–6,85)	0,928	7,7 (0,57–76,92)	0,822	6,23 (0,50–91,57)	0,771
	20	1,57 (0,46–2,74)		1,16 (0,88–1,76)		9,57 (0,43–46,95)		7,28 (0,37–26,68)	
Indeks massa tubuh	30	1,61 (0,41–10,30)	0,251	1,16 (0,79–1,76)	0,216	9,33 (0,57–76,92)	0,162	7,55 (0,50–91,57)	0,098
	121	1,37 (0,01–4,36)		1,18 (0,86–6,85)		7,79 (0,43–33,84)		6,18 (0,37–27,13)	

* Median (minimum–maksimum); ^{mww}: *Mann-Whitney U* test; ^{kw}: *Kruskal Wallis* test

Tabel 4.21. Profil Parameter Pemeriksaan Tiroid Berdasarkan Karakteristik Kegiatan Terpapaj Pestisida

Kegiatan Terpapaj Pestisida	n	TSH*	p ^{mw}	FT4*	p ^{mw}	Tiroglobulin*	p ^{mw}	Rasio Tg/FT4*	p ^{mw}
Alat semprot	35	1,69 (0,01-4,36)	0,189	1,16 (0,79-1,69)	0,365	7,59 (0,43-18,62)	0,322	6,18 (0,37-17,10)	0,528
Waktu aplikasi	116	1,36 (0,01-10,30)	0,076	1,15 (0,79-1,76)	0,159	7,91 (0,57-76,92)	0,994	6,24 (0,50-91,57)	0,632
Jumlah jenis pestisida yang digunakan	60	1,36 (0,01-9,51)	0,023	1,18 (0,86-6,85)	0,09	7,46 (0,57-31,74)	0,249	6,12 (0,50-27,13)	0,564
Kombinasi pestisida tambahan [#]	44	1,18 (0,01-3,21)	0,149 ^{kw}	1,14 (0,90-1,69)	0,161 ^{kw}	7,48 (0,57-33,84)	0,140 ^{kw}	5,96 (0,50-22,86)	0,342 ^{kw}
Mengelap keringat dengan baju kerja	107	1,51 (0,01-10,30)	0,013	1,18 (0,79-6,85)	0,610	7,95 (0,43-76,92)	0,266	6,25 (0,37-91,57)	0,335
Memasuki kembali area paska semprot	9	12,44 (1,60-18,13)	0,001	1,58 (0,62-3,70)	0,248	1,20 (1,06-1,54)	0,178	8,71 (1,29-17,10)	0,252
Terpercik saat menyemprot	19	6,49 (0,57-24,93)	0,019	1,34 (0,61-2,57)	0,246	1,20 (0,96-1,57)	0,294	5,40 (0,50-23,30)	0,444
Terpercik saat menuang	55	8,43 (0,91-76,92)	0,019	1,67 (0,01-9,51)	0,246	1,19 (0,84-6,85)	0,852	6,65 (0,95-91,57)	0,789
Kontak langsung dengan pestisida	68	6,08 (0,43-46,95)	0,028	1,29 (0,01-10,30)	0,700	1,14 (0,79-1,76)	0,584	5,40 (0,37-26,68)	0,784
Memakai baju kerja lengan panjang	29	1,03 (0,41-3,21)	0,001	1,17 (0,91-1,57)	0,700	6,67 (0,77-19,13)	0,810	6,18 (0,73-19,96)	0,773
Memakai celana panjang	122	1,59 (0,01-10,30)	0,001	1,17 (0,79-6,85)	0,266	7,91 (0,43-76,92)	0,810	6,23 (0,37-91,57)	0,003
Dosis Paparan Kumulatif	33	1,16 (0,33-3,64)	0,001	1,19 (0,97-1,90)	0,640	6,42 (2,00-21,62)	0,002	5,02 (1,77-21,82)	0,003
DPK Tinggi	118	1,49 (0,01-10,30)	0,001	1,17 (0,79-6,85)	0,640	8,14 (0,43-76,92)	0,002	6,67 (0,37-91,57)	0,003
DPK Rendah	132	1,36 (0,01-10,30)	0,001	1,17 (0,79-6,85)	0,266	7,40 (0,77-76,92)	0,002	6,15 (0,73-91,57)	0,003

* Median (minimum-maksimum); ^{mw}: Mann-Whitney U test; ^{kw}: Kruskal Wallis test; [#] Detail pengelompokan terdapat pada Tabel 4.5.

Menurut karakteristik sosiodemografi pada Tabel 4.20. konsentrasi FT4 pada petani laki-laki lebih tinggi daripada perempuan. Kadar TSH di antara perokok lebih rendah daripada non-perokok tetapi perbedaannya tidak bermakna, sementara tiroglobulin dan FT4 pada perokok lebih tinggi daripada non-perokok. Pada Tabel 4.21. subjek yang menggunakan ≤ 3 jenis pestisida memiliki median TSH yang lebih tinggi namun jenis kombinasi pestisida tidak berhubungan dengan fungsi tiroid. Subjek yang jarang atau tidak pernah menyeka keringat dengan pakaian kerja memiliki median TSH yang lebih tinggi. Rerata kadar tiroglobulin dan TSH yang lebih tinggi secara bermakna juga ditemukan pada kelompok DPK tinggi. Namun, tidak ada perbedaan yang bermakna dalam kadar tiroglobulin dan FT4 menurut karakteristik pekerjaan subjek.

Tabel 4.22. Analisis Regresi Linier Sederhana antara Variabel yang Berkontribusi terhadap TSH

Kontributor	B	SE (B)	Beta	IK 95%	p
Umur	0,01	0,01	0,07	-0,01 ; 0,03	0,428
Jenis kelamin	-0,04	0,38	-0,01	-0,79 ; 0,70	0,908
IMT	0,07	0,04	0,15	-0,01 ; 0,14	0,073
Kebiasaan merokok	0,03	0,22	0,01	-0,40 ; 0,42	0,890
Ekskresi yodium urin	-0,002	0,001	-0,16	-0,004 ; < -0,001	0,044
Tiroglobulin	0,064	0,01	0,43	0,04 ; 0,09	< 0,001
FT4	-0,43	0,22	-0,16	-0,86 ; -0,002	0,049
Rasio Tg/FT4	0,08	0,01	0,52	0,06 ; 0,10	< 0,001
Hari setelah aplikasi	0,14	0,06	0,18	0,02 ; 0,27	0,023
DPK	-0,75	0,21	-0,28	-1,17 ; -0,334	< 0,001
Jumlah jenis pestisida	0,56	0,24	0,19	0,10 ; 1,03	0,018
Waktu aplikasi	0,34	0,22	0,12	-0,10 ; 0,77	0,131

Tabel 4.22. menampilkan hubungan antara kadar TSH dan faktor yang potensial berkontribusi. Menggunakan regresi linier sederhana, diperoleh sejumlah variabel yang terkait dengan TSH pada tingkat kemaknaan $p < 0,20$ dan oleh karenanya diikutsertakan ke dalam model multivariat, kecuali tiroglobulin karena terdapat kolinearitas dengan rasio Tg/FT4. Melalui prosedur *stepwise* yang ditampilkan pada Tabel 4.23. rasio Tg/FT4, DPK, jumlah hari setelah penyemprotan, ekskresi yodium urin (EYU) dan FT4 dipertahankan dalam model akhir. Kadar TSH lebih tinggi diperoleh pada kelompok yang terpajan tinggi ($p = 0,002$). Kadar EYU ($p =$

0,026) dan FT4 ($p = 0,033$) berhubungan negatif dengan kadar TSH sedangkan rasio Tg/FT4 ($p < 0,001$) dan jumlah hari setelah penyemprotan ($p = 0,003$) berhubungan positif dengan TSH.

Tabel 4.23. Analisis Regresi Linier Ganda antara Variabel yang Berkontribusi terhadap TSH

Kontributor	B	SE (B)	Beta	IK 95%	p
Konstanta	1,95	0,34		1,28 ; 2,61	< 0,001
Rasio Tg/FT4	0,07	0,01	0,45	0,05 ; 0,09	< 0,001
DPK	-0,58	0,18	-0,22	-0,94 ; -0,23	0,002
Hari setelah aplikasi	0,16	0,05	0,20	0,06 ; 0,26	0,003
EYU	-0,002	0,001	-0,15	-0,003 ; <-0,001	0,026
FT4	-0,39	0,18	-0,14	-0,74 ; -0,03	0,033

B = *Parameter estimate*; SE (B) = Standar eror untuk B

$R^2 = 0,38$; R^2 suaian= 0,36

Rasio Tg/FT4 (numerik)

DPK: tinggi (referensi) atau rendah

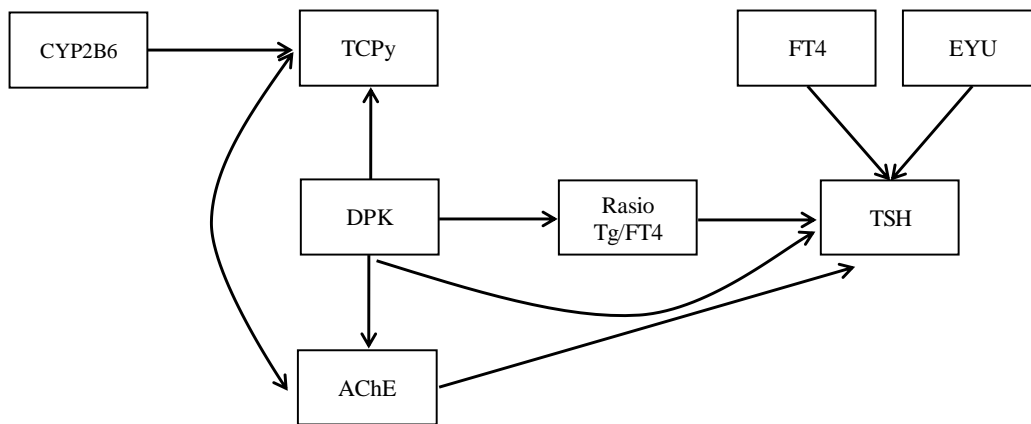
Hari setelah aplikasi (numerik)

Ekskresi yodium urin (EYU) dalam $\mu\text{g/L}$ (Numerik)

FT4 dalam $\mu\text{g/L}$ (numerik)

4.5 Interaksi Dosis Paparan Kumulatif Klorpirifos, Markah Kerentanan, Markah Paparan dan Efeknya terhadap Tiroid

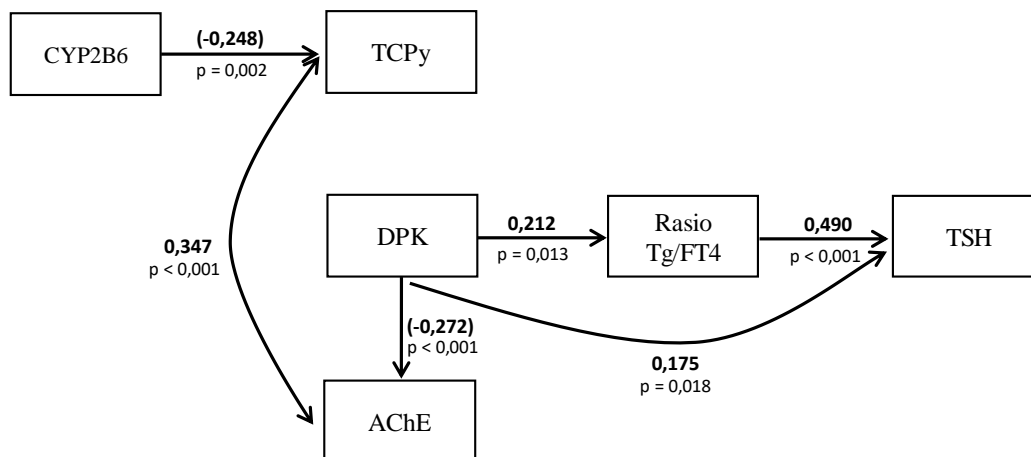
Analisis jalur (*Path analysis*) dilakukan dengan program JASP versi 0.14.1 (*University of Amsterdam*) untuk menguji model hubungan kausalitas faktor-faktor yang berkontribusi terhadap fungsi tiroid. Variabel eksogen dalam model adalah CYP2B6, FT4, EYU dan DPK, sementara variabel endogen terdiri dari TCPy, AChE, DPK, rasio Tg/FT4 dan TSH. Pada tahap awal, model analisis jalur di Gambar 4.2. dikonstruksikan berdasarkan teori dan hasil analisis regresi linier. Polimorfisme genetik CYP2B6 diuji sebagai variabel independen untuk TCPy, sementara FT4, EYU, rasio Tg/FT4, DPK, dan AChE diuji sebagai variabel independen untuk TSH.



Gambar 4.2. Konstruksi Model Analisis Jalur Faktor Risiko terhadap Kadar TSH

Keterangan gambar:

→ panah 1 arah: hubungan regresi; ↔ panah 2 arah: korelasi



Gambar 4.3. Model Akhir Analisis Jalur Faktor Risiko terhadap Kadar TSH

Keterangan gambar:

→ panah 1 arah: hubungan regresi disertai dengan koefisien regresi

↔ panah 2 arah: korelasi disertai dengan koefisien korelasi

(-): koefisien regresi negatif

CYP2B6: 0 (referensi; *1/*1), 1 (*1/*6), 2 (*6/*6)

DPK: 0 (referensi; DPK rendah), 1 (DPK tinggi)

Uji parameter ketepatan model:

$n = 132$; χ^2 (df) = 4,512 (6); $p = 0,608$

Comparative Fit Index (CFI) : 1,000

Tucker-Lewis Index (TLI) : 1,043

Bentler-Bonett Normed Fit Index (NFI) : 0,953

Goodness of Fit Index (GFI) : 0,984

RMSEA : 0,000

SRMR : 0,039

R^2 terhadap TSH : 0,307

Hasil analisis terhadap parameter ketepatan model menunjukkan bahwa model pada Gambar 4.3. merupakan model yang fit karena memenuhi kriteria nilai p *Chi-Square* $> 0,05$; CFI $\geq 0,90$; TFI, NFI dan GFI $\geq 0,95$; serta RMSEA dan SRMR $< 0,08$.

Model akhir dalam Gambar 4.3. menunjukkan bahwa rasio Tg/FT4 ($\beta = 0,490$; $p < 0,001$) dan DPK ($\beta = 0,175$; $p = 0,018$) memiliki efek langsung positif terhadap TSH. Efek tidak langsung DPK pada TSH didapati melalui rasio Tg/FT4 sebesar 0,104 dan bersama efek langsung sebesar 0,175 memberikan efek total terhadap TSH sebesar 0,279. AChE dan TCPy memiliki korelasi positif. Seluruh koefisien dalam analisis jalur bermakna pada $p < 0,05$ dan model ini dapat menjelaskan 30,7% varian TSH pada subjek.

BAB 5

PEMBAHASAN

Sektor pertanian di Indonesia ditandai dengan tingginya keterlibatan petani di sektor pertanian informal dan banyak menggunakan insektisida untuk membasmi hama. Perilaku penggunaan insektisida, khususnya CPF, yang buruk akibat penggunaan dengan konsentrasi berlebihan dan frekuensi lebih sering berpotensi mengganggu kelenjar tiroid. Penelitian ini bertujuan memperjelas peran pajanan CPF berupa DPK, PON-1, AChE, TCPy bersama variasi genetik CYP2B6 dan CYP2C19 terhadap kejadian disrupsi tiroid pada penyemprot pestisida. Di bawah ini adalah pembahasan atas hasil penelitian.

5.1 Karakteristik Pajanan Kumulatif Populasi Penelitian

5.1.1 Estimasi Dosis Pajanan Kumulatif

Berdasarkan rerata usia subjek, penggunaan pestisida pada aktivitas pertanian dan jumlah hari penyemprotan dalam setahun menunjukkan bahwa petani telah menjalani sebagian besar hidup mereka pada profesi ini. Hal ini diperkuat dengan penjelasan dari petani yang berpartisipasi dalam penelitian ini, bahwa metode pertanian serta praktik kerja mereka merupakan warisan turun-temurun dan telah dilaksanakan selama bertahun-tahun. Tingkat pajanan kumulatif diestimasi menggunakan metode yang tervalidasi dalam *Agricultural Health Study*⁶³ berdasarkan hasil pengamatan dan wawancara. Skor intensitas pajanan dalam algoritme yang dipergunakan dalam penelitian ini memiliki reliabilitas yang baik.¹⁰³ Wawancara terstruktur yang dilakukan dapat meningkatkan keakuratan informasi yang diperoleh sekaligus mengonfirmasi konsistensi jawaban yang diberikan oleh subjek. Di sisi lain, estimasi yang dilakukan akan memberikan hasil yang lebih tajam bila disertai dengan pengamatan langsung terhadap setiap parameter yang dinilai sebagai konfirmasi terhadap informasi yang disampaikan oleh subjek. Namun hal ini tentunya membutuhkan waktu dan sumber daya manusia (petugas) yang harus secara khusus melakukan aktivitas tersebut, sehingga bila dilakukan pada populasi penelitian yang cukup besar akan memiliki tingkat kesulitan tersendiri. Sebagai alternatif upaya terhadap kendala tersebut, pengamatan aktivitas pertanian dapat dilakukan bersama dengan strategi *similar exposure group* pada populasi penelitian.

Tingkat intensitas pajanan pada kelompok DPK tinggi secara bermakna lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok DPK rendah karena nilai estimasi yang secara bermakna lebih tinggi untuk sejumlah komponen utama yaitu penggunaan APD, praktik kebersihan pribadi, dan penanganan dalam kontak langsung terhadap pestisida. Karena penggunaan APD dengan benar sangat penting dalam strategi pengendalian pajanan, keadaan tidak menggunakan APD yang tepat akan menghasilkan dosis internal yang lebih tinggi. Beberapa penelitian telah membahas bukti manfaat penggunaan APD yang tepat yang secara bermakna terkait dengan metabolit dimetil yang lebih rendah¹⁰⁴, konsentrasi DAP yang lebih rendah¹⁰⁵ dan penggunaan *coverall* selama penanganan dan penyemprotan pestisida secara bermakna terkait dengan tingkat metabolit OP yang lebih rendah.¹⁰⁶

Kondisi pertanian setempat maupun sejumlah karakteristik yang tidak dinilai dalam algoritme ini di antaranya kontak dengan tanaman yang telah disemprot, kondisi lingkungan (suhu, angin) saat penyemprotan, dan penggunaan bahan tambahan lain pada pestisida dapat memiliki pengaruh pada estimasi pajanan yang dilakukan, namun pengaruhnya tidaklah substansial.^{107,108} Sebaliknya, dalam penelitian ini didapatkan bahwa penggunaan pakaian berlengan panjang dan celana panjang saat menyemprotkan pestisida, rerata volume campuran pestisida yang disemprot dan luas lahan yang diolah menunjukkan hubungan yang bermakna dengan DPK pada subjek penelitian, menjadikannya variabel yang penting untuk diperhitungkan dalam estimasi DPK.

5.1.2 Upaya Perlindungan terhadap Pajanan

Petani di sektor pertanian skala kecil yang dicirikan memiliki kesadaran yang rendah tentang konsekuensi kesehatan akibat pajanan pestisida, pengetahuan yang terbatas tentang praktik penanganan pestisida yang tepat, dan juga penggunaan alat pelindung diri (APD) tingkat rendah, mungkin tidak menyadari bahwa mereka rentan terhadap dampak kesehatan akibat pajanan CPF.¹⁰⁹⁻¹¹¹ Keadaan yang tidak jauh berbeda juga ditemukan pada subjek penelitian ini.

Pajanan melalui kulit dan inhalasi merupakan rute utama pajanan pestisida pertanian.¹¹² Semua CPF dan sebagian besar pestisida tambahan yang digunakan oleh subjek penelitian berada dalam konsentrat emulsi yang dapat diserap melalui

kontak kulit. Dengan demikian, kontak langsung harus dihindari, dan pelindung kulit yang tepat seperti penggunaan sarung tangan kimia, atau *coverall* diharapkan dapat mengurangi dosis pajanan,¹¹³ akan tetapi faktanya adalah bahwa sebagian besar subjek penelitian melaporkan adanya kontak langsung maupun terpercik atau terkena tumpahan pestisida dalam aktivitas pertanian yang dilakukan. Sementara itu di sisi lain, proporsi penggunaan APD yang baik dalam populasi penelitian ini hanya 2% sedangkan proporsi petani yang tidak menggunakan APD sama sekali adalah 15% yang dapat menggambarkan risiko petani terhadap potensi dampak kesehatan akibat pajanan pestisida. Kondisi serupa tentang rendahnya frekuensi penggunaan APD ini telah dilaporkan oleh sejumlah penelitian pada pekerja pertanian di berbagai negara.^{111,114,115} APD yang paling sering digunakan dalam populasi penelitian ini adalah masker dan sepatu bot yang pada umumnya tidak memberikan perlindungan yang cukup terhadap pajanan CPF. Namun, peneliti juga menemukan bahwa pemakaian pakaian lengan panjang dan celana panjang saat menyemprot pestisida berhubungan dengan DPK. Temuan ini relevan untuk mengurangi dosis pajanan karena pakaian lengan panjang dan celana panjang memberikan penghalang parsial terhadap kontak langsung karena percikan atau tumpahan.^{112,113}

Hirarki pengendalian yang didefinisikan oleh *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH) dimulai dengan langkah paling efektif yaitu eliminasi atau menghilangkan bahaya, diikuti oleh substitusi, kontrol atau rekayasa teknis, kontrol administratif, dan upaya yang paling tidak efektif yaitu penggunaan APD.¹¹⁶ Eliminasi, substitusi, dan kontrol/rekayasa teknis akan sangat sulit untuk diterapkan dalam sektor pertanian informal sehingga hanya menyisakan 2 pilihan. Kebanyakan individu akan sangat bergantung pada APD sebagai pilihan terakhir. Namun, secara umum dapat diterima bahwa penggunaan APD saja tidak selalu menghasilkan perlindungan yang memadai.¹¹⁷ Oleh karenanya, pengendalian administratif untuk mengubah cara kerja petani harus dilakukan bersamaan dengan penggunaan APD. Sehubungan dengan praktik kebersihan diri dan penanganan dalam kontak langsung terhadap pestisida, hampir seluruh subjek melaporkan telah mandi dengan benar dan mengganti pakaian setelah penyemprotan, sesuai dengan hasil dari penelitian lain.^{115,118} Namun data mengenai pengelolaan pakaian kerja

misalnya dengan dicuci sebelum digunakan kembali tidak diperoleh dari subjek. Semua petani juga mengaku mencuci tangan setelah penyemprotan, setelah terkena pestisida dan sebelum makan. Hal ini cenderung lebih mewakili pengetahuan umum ketimbang sikap maupun perilaku sehari-hari yang dapat bermanfaat dalam pengendalian pajanan. Keadaan ini serupa dengan kondisi yang dilaporkan dalam penelitian sebelumnya di Iran dan Indonesia bahwa tidak ada konsistensi antara persepsi dan praktik kerja pada populasi yang diteliti.^{115,119} Namun demikian, tindakan segera mengganti pakaian setelah terpajan pestisida secara bermakna berhubungan dengan tingkat pajanan yang lebih rendah, sehingga praktik ini menjadi penting dalam pengendalian pajanan, terutama untuk mengurangi waktu pajanan melalui kontak kulit.¹⁰⁶

5.1.3 Karakteristik Penggunaan Pestisida

Penggunaan pestisida sesuai dengan petunjuk penggunaan hanya dilakukan oleh sedikit petani. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa tingkat pendidikan mendorong perilaku keselamatan di kalangan petani.^{119,120} Petani dengan tingkat pendidikan yang lebih tinggi, pada umumnya memiliki kesadaran tentang perilaku keselamatan yang lebih baik selama bekerja dengan pestisida. Pendidikan yang lebih tinggi juga akan membantu petani untuk mendapatkan pengetahuan yang relevan tentang praktik kerja yang dilakukan dan metode pemilihan APD yang tepat.¹²¹ Di luar aktivitas utama dalam kegiatan bertani di ladang, subjek penelitian mungkin terpajan dengan pestisida dalam kegiatan pengelolaan benih yang dilakukan dalam rangkaian aktivitas di antaranya berupa menyiapkan larutan fungsida, merendam siung, mengeluarkan siung dari rendaman dan menyimpannya. Frekuensi penyemprotan pestisida yang dilakukan melebihi anjuran penggunaan 1 kali per minggu, menyebabkan dosis pajanan yang lebih besar akan diterima oleh petani.

Mengenai penggunaan pestisida gabungan, 94% dari subjek melaporkan menggunakan dua atau lebih pestisida sebagai campuran dalam satu kesempatan penyemprotan. Kondisi serupa yakni bahwa sebagian besar petani menggunakan pestisida gabungan juga ditemukan di sejumlah negara lain.^{111,114} *Ethylene-bis-dithio-carbamate* (EBDC) mancozeb dan abamektin adalah fungsida dan insektisida yang paling sering digunakan pada populasi penelitian ini dan serupa

dengan penelitian sebelumnya.¹²² Penggunaan pestisida tambahan bersama dengan CPF menjadikan petani lebih rentan terhadap kemungkinan munculnya dampak kesehatan yang tidak diinginkan. Hampir separuh dari subjek menggunakan insektisida tambahan berbahan aktif abamektin atau beta siflutrin atau metomil. Ketiga bahan aktif insektisida ini tergolong dalam kelas Ib menurut klasifikasi WHO yang menunjukkan potensi toksisitas akut yang lebih besar. Walaupun tidak ditemukan keterkaitan antara penggunaan insektisida tambahan ini dengan markah pajanan maupun efek pada tiroid, namun penggunaan pestisida gabungan oleh subjek harus tetap menjadi perhatian mengingat potensi interaksi campuran yang digunakan dan kemungkinan toksisitas akut akibat penggunaan yang tidak aman.

Penjelasan di atas memberikan gambaran yang lebih jelas dan detail mengenai karakteristik okupasi petani sektor informal di Jawa yang juga merepresentasikan kondisi di sejumlah daerah lain di Indonesia maupun negara lain yaitu bahwa petani sektor informal ditandai karakteristik okupasi berupa tingginya proporsi penggunaan pestisida gabungan, rendahnya frekuensi penggunaan APD terutama pelindung kulit dan praktik kerja yang buruk dalam kekerapan kontak langsung dengan pestisida. Keadaan ini juga disertai dengan tingginya volume pestisida yang disemprotkan dan lahan olahan yang luas. Temuan ini sekaligus menunjukkan kurangnya pengetahuan tentang cara penggunaan pestisida yang benar, ketidaksadaran akan potensi dampak kesehatan, dan cara mengelola pajanan.

5.2 Markah Pajanan Klorpirifos

5.2.1 Efek Kegiatan Terpajan Pestisida terhadap PON-1

Paraoksonase-1 berperan dalam proses detoksifikasi CPF-O yang dihasilkan dari metabolisme fase 1 CPF dalam hepar menjadi DEP dan TCPy.³⁸ Kadar PON-1 pada kelompok DPK tinggi dan perokok lebih rendah dibandingkan dengan kelompok DPK rendah dan bukan perokok, namun perbedaan tersebut tidak bermakna. Demikian juga dengan kadar PON-1 pada variabel kegiatan terpajan pestisida lainnya yang tidak memberikan bukti adanya perbedaan. Tidak didapatkannya efek pajanan CPF terhadap kadar PON-1 dalam penelitian ini mungkin terjadi karena proses metabolisme CPF juga melibatkan sejumlah enzim di antaranya karboksilesterase, butirilkolinesterase, dan CYP. Akan tetapi mengingat bahwa

tidak dilakukan pemeriksaan kadar enzim-enzim tersebut, maka interaksi yang mungkin ditimbulkannya bersama dengan PON-1 dalam metabolisme CPF tidak dapat diketahui.

Kebiasaan merokok, pajanan organofosfat, konsumsi obat statin, hingga asupan diet dapat memengaruhi aktivitas PON-1,^{33,40} namun pengaruh terbesar berasal dari polimorfisme genetik pada gen pengkodennya. Polimorfisme yang utama pada PON-1 adalah Q192R dan L55M. SNPs Q192R berhubungan dengan aktivitas hidrolisis enzim PON-1 sehingga dapat memengaruhi efisiensi reaksi katalisis dalam metabolisme pestisida, sementara SNPs L55M mengubah kadar dan stabilitas protein PON-1 pada plasma sehingga memengaruhi aktivitas enzimatisnya.^{34,39,86} Polimorfisme gen PON-1 tidak dianalisis dalam penelitian ini sehingga tidak diketahui status variasi genetik pada subjek penelitian yang dapat memengaruhi penilaian hubungan PON-1 dengan pajanan CPF.

5.2.2 Efek Kegiatan Terpajan Pestisida terhadap AChE

Aktivitas AChE pada subjek penelitian berhubungan dengan DPK, umur, hari setelah aplikasi pestisida dan kadar TCPy. Aktivitas AChE eritrosit pada subjek dengan DPK tinggi secara bermakna lebih rendah dibandingkan dengan kelompok DPK rendah. Hal ini memberikan gambaran bahwa subjek terpajan dengan bahan yang memiliki potensi inhibisi terhadap aktivitas AChE, di antaranya adalah CPF.^{30,31} CPF merupakan inhibitor lemah terhadap aktivitas AChE,¹¹ dan melalui aktivasi ke dalam bentuk metabolit aktif CPF-O, potensi inhibisi terhadap AChE menjadi lebih besar, oleh karenanya, aktivitas AChE yang menurun dapat memberikan gambaran besarnya metabolit CPF-O yang menginhibisi AChE. Dalam penelitian ini, pada setiap subjek hanya dilakukan 1 kali pemeriksaan AChE. Ketiadaan data dasar pada setiap subjek menjadikannya tidak mungkin untuk menilai penurunan aktivitas AChE sebelum dan setelah terpajan, namun aktivitas AChE yang diukur saat ini merepresentasikan tingkat toksisitas pada tahap awal pajanan dan selama proses pemulihan aktivitas yang berlangsung, sehingga tanpa pajanan yang berulang aktivitas AChE diharapkan dapat pulih kembali setelah 82 hari atau mendekati masa hidup eritrosit.¹²³

Kadar TCPy berhubungan positif dengan aktivitas AChE. Hubungan antara kadar TCPy dan AChE dalam beberapa studi masih belum konklusif. Hasil yang diperoleh dalam studi ini tidak sejalan dengan hasil dari studi sebelumnya yang menyatakan bahwa terdapat korelasi negatif antara kadar TCPy dengan AChE.¹²⁴ Kadar TCPy dan AChE pada penelitian ini dipengaruhi oleh waktu pemeriksaan (hari setelah aplikasi), yang dalam penelitian ini sangat tergantung kepada komitmen kehadiran subjek sesuai jadwal yang ditetapkan. Selain itu, mengingat bahwa TCPy menggambarkan besarnya metabolit yang dihasilkan dalam proses metabolisme CPF dan konsentrasi TCPy mencerminkan pajanan terkini dengan waktu paruh yang relatif singkat, maka analisis hubungan asosiasi dari TCPy lebih tepat bila dilakukan terhadap besarnya inhibisi AChE daripada terhadap kadar AChE sewaktu berdasarkan 1 kali pengukuran.

5.2.3 Efek Variasi Genetik CYP2B6 dan CYP2C19 terhadap TCPy

Studi saat ini menunjukkan bahwa polimorfisme CYP2B6*6 didapatkan pada setiap 2 dari 3 di antara populasi penelitian. Terhadap referensi pada Tabel 2.2. dan 2.3. terlihat bahwa frekuensi alel minor (FAM) dari CYP2B6 785A>G dan 516G>T di antara subjek penelitian serupa dengan populasi Iran dan populasi Timor, namun lebih tinggi bila dibandingkan terhadap populasi Asia Timur. Prevalensi genotip homozigot CYP2B6*6 pada populasi penelitian ini mirip dengan populasi Timor tetapi lebih tinggi dibandingkan dengan populasi etnis Turki, Mesir, Iran, dan etnis Han Cina (2,1–8,7%). Frekuensi alel minor CYP2C19*2 dan *3 pada populasi studi ini serupa dengan populasi Han China, namun lebih tinggi dibandingkan dengan populasi di Mesir dan khususnya FAM *2 lebih rendah dibandingkan Thailand. Selain itu, tidak didapatkan perbedaan distribusi genotipe menurut kelompok jenis kelamin atau kelompok DPK.

TCPy urin terdeteksi pada seluruh subjek penelitian. Namun, ditemukannya TCPy yang terukur dalam urin tidak serta merta berarti akan menyebabkan efek kesehatan yang merugikan, oleh karena itu, monitoring biologis TCPy di antara petani akan memberikan informasi penting untuk menentukan apakah individu telah terpajan CPF dalam jumlah tertentu. Kadar TCPy urin pada populasi penelitian ini serupa dengan penelitian sebelumnya pada populasi umum.¹²⁵⁻¹²⁷ Namun demikian, dibandingkan

dengan penelitian lain pada populasi yang terpajan CPF secara masif, hasil ini berada jauh di bawahnya.¹²⁴ Perbedaan sifat pajanan di antaranya konsentrasi pestisida, metode aplikasi, atau kondisi iklim mungkin berkontribusi pada perbedaan hasil ini.

Hubungan linier kadar TCPy dengan kelompok polimorfisme gen CYP2B6*6 teramati dalam studi ini. Subjek pada kelompok *1/*1 memiliki konsentrasi TCPy yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok *1/*6 dan *6/*6. Adanya variasi genetik CYP dapat memengaruhi kerentanan terhadap potensi dampak kesehatan atau sebaliknya potensi efek perlindungan pada subjek yang terpajan xenobiotik.^{38,43} CYP2B6 adalah salah satu enzim terpenting dalam metabolisme CPF, oleh karena itu individu dengan ekspresi CYP2B6 yang lebih tinggi, yaitu CYP2B6*1/*1, lebih rentan terhadap pajanan CPF karena tingkat pembentukan CPF-O yang lebih tinggi, yang ditunjukkan oleh kadar TCPy yang lebih besar.¹¹ Frekuensi genotip *1/*1 pada populasi penelitian ini lebih rendah dibandingkan dengan populasi di China dan Mesir, memberikan informasi bahwa proporsi populasi dengan kerentanan genetik yang lebih rendah terhadap dampak pajanan CPF pada populasi penelitian ini lebih tinggi di bandingkan China dan Mesir.

Peran dan kemaknaan CYP450 (CYP) dalam biometabolisme pada manusia telah dipelajari sebelumnya. CYP manusia diketahui memiliki beberapa peran penting sehubungan dengan kemampuannya mengatalisis sejumlah besar metabolisme obat-obatan dan bahan kimia termasuk pada metabolisme pestisida. Terdapat 57 gen fungsional CYP dengan 12 di antaranya mengode enzim yang bertanggung jawab atas lebih dari 75% oksidasi fase 1.^{12,43,44} Di antara gen fungsional tersebut, CYP1, CYP2, dan CYP3 adalah gen utama yang berperan sangat penting.¹²⁸ Beberapa insektisida OP termasuk CPF, diazinon, dan paration diaktifkan menjadi bentuk oksonnya melalui reaksi yang dikatalisis oleh sejumlah CYP.^{27,47}

Sejumlah CYP seperti CYP1A2, 3A4, 2D6, 2B6 dan 2C19 terlibat dalam metabolisme CPF. CYP2B6 dan CYP2C19 merupakan CYP yang paling aktif dengan CYP2B6 berperan dalam reaksi desulfurisasi (aktivasi) CPF sementara CYP2C19 pada reaksi dearilasi (detoksifikasi).^{47,129} Oleh karenanya individu dengan ekspresi CYP2B6 yang tinggi dan CYP2C19 yang rendah lebih rentan mengalami dampak pajanan.¹¹ Mengikuti jalur bioaktivasi dan detoksifikasi CPF

yang terutama diperantarai oleh CYP2B6 dan CYP2C19, terbentuklah metabolit spesifik TCPy yang diekskresikan dalam urin.^{27,129} Oleh karena itu, kadar TCPy yang merefleksikan besarnya estimasi penyerapan internal CPF, telah digunakan sebagai markah pajanan CPF dalam sejumlah studi epidemiologi.^{91,118,124}

CYP2B6 sangat polimorfik dalam hal ekspresi dan aktivitas enzimatisnya yang disebabkan oleh *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) sehingga varian genetik yang ada akan menyebabkan variabilitas antar-individu yang bermakna.⁵⁰ CYP2B6 berperan besar dalam metabolisme bahan xenobiotik dan sejumlah obat terapeutik yang penting seperti siklofosamid, artemisinin dan efavirenz.⁴⁹ Sehubungan dengan perannya pada metabolisme CPF, CYP2B6 merupakan katalis yang paling menonjol dalam bioaktivasi CPF. Alel CYP2B6*6 menunjukkan karakteristik alel non-fungsional, dan karenanya dapat dikategorikan sebagai *poor metabolizer*. Terjadinya *aberrant splicing* pada varian *6 menyebabkan hilangnya ekson 4–6 yang menyebabkan defek berupa mRNA fungsional dengan jumlah dan fungsi yang sangat berkurang.⁵¹ Aktivitas kinetik pada varian CYP2B6*6 serupa dengan *wild-type* namun diekspresikan pada tingkat yang lebih rendah sehingga terjadi penurunan tajam dalam kemampuan pembentukan CPF-O.^{10,44}

CYP2C19 memiliki peran penting dalam proses detoksifikasi CPF menjadi metabolit inaktif TCPy, namun adanya variasi genetik pada gen ini dapat memengaruhi fungsi enzimatisnya. Alel CYP2C19*2, *3, *4, *5, *6, *7, *8 diketahui merupakan alel non-fungsional, akan tetapi alel selain *2 dan *3 frekuensinya sangat kecil pada populasi Asia khususnya Asia Timur. Varian CYP2C19*2 dan *3 menghasilkan *premature stop codon* yang merupakan *non-functional protein*.^{45,52} Oleh karena itu, varian homozigot CYP2C19*2 dan *3 disebut dengan *poor metabolizer* dan heterozigot *1/*2 atau *1/*3 sebagai *intermediate metabolizer* karena memiliki aktivitas enzimatis yang lebih rendah yang mengakibatkan menurunnya proses detoksifikasi CPF.^{10,43} Hasil penelitian saat ini tidak menunjukkan adanya perbedaan kadar TCPy berdasarkan variasi genetik CYP2C19 dan serupa dengan studi sebelumnya.¹⁰ Hal ini dapat dijelaskan melalui pemahaman bahwa proses metabolisme CPF berlangsung cukup kompleks dengan keterlibatan PON-1, kolinesterase, dan sejumlah enzim CYP. Pada proses ini, bioaktivasi CPF menjadi CPF-O yang diperantarai oleh

CYP2B6 diperkirakan lebih dominan dibandingkan proses detoksifikasi CPF menjadi TCPy oleh CYP2C19, mengindikasikan bahwa CYP2B6 berperan sentral dalam keseimbangan metabolisme CPF. Keterlibatan enzim CYP lain seperti CYP3A4 dan 1A2 dapat mengkompensasi hilangnya fungsi detoksifikasi CPF pada individu dengan gen CYP2C19 non-fungsional.^{10,34}

5.2.4 Efek Kegiatan Terpajan Pestisida terhadap TCPy

Analisis statistik menunjukkan bahwa DPK, kebiasaan merokok, IMT, dan waktu aplikasi bersama dengan variasi genetik CYP2B6 berhubungan dengan konsentrasi TCPy urin pada subjek. TCPy sebagai metabolit spesifik pajanan CPF berhubungan positif dengan DPK dengan kelompok DPK tinggi yang ditandai dengan frekuensi penggunaan APD yang rendah dan praktik kerja yang buruk memiliki konsentrasi TCPy yang lebih tinggi.

TCPy urin secara bermakna lebih rendah di antara perokok daripada non-perokok, pola ini mirip dengan penelitian sebelumnya, dan gangguan dalam metabolisme atau eliminasi xenobiotik yang terjadi pada perokok mungkin menjadi penyebabnya.^{130,131} Pengukuran TCPy menggunakan urin sewaktu menunjukkan variabilitas dari waktu ke waktu pada individu yang terpajan CPF dari lingkungan. Berdasarkan fakta bahwa konsentrasi TCPy urin mencerminkan pajanan CPF terkini dan akan dieliminasi melalui urin dengan waktu paruh sekitar 27 jam,^{27,31} maka dapat dimengerti bahwa jumlah hari setelah pajanan berhubungan negatif dengan konsentrasi TCPy.

Indeks massa tubuh (IMT) yang lebih tinggi dalam penelitian ini berhubungan dengan kadar TCPy yang lebih rendah. Hal ini terjadi karena senyawa induk CPF bersifat lipofilik, sehingga konsentrasi tertinggi terdapat dalam jaringan lemak atau adiposa, yang mengarah pada dugaan bahwa jaringan lemak mungkin memainkan peran penting dalam laju eliminasi CPF.³¹ Walaupun konsentrasi CPF pada jaringan lemak sangat tinggi, namun CPF tidak terakumulasi secara bermakna pada jaringan lemak karena waktu paruh eliminasinya kurang dari 3 hari. CPF yang terikat/tersimpan sementara waktu pada jaringan lemak akan dilepaskan dan mengalami metabolisme membentuk CPF-O sehingga efek yang ditimbulkan dapat berlangsung dalam jangka waktu yang lebih panjang.^{28,31} Oleh karenanya, penting bagi setiap

penyemprot pestisida untuk berada dalam keadaan gizi terbaik dengan IMT yang ideal untuk mengurangi kemungkinan laju eliminasi CPF yang lebih lambat.

Mengenai waktu penyemprotan, pada pagi hari udara cenderung lebih tenang daripada di waktu lain sehingga mengurangi risiko bahan kimia terhirup secara tidak sengaja karena angin kencang. Suhu yang lebih rendah dan kelembaban yang relatif lebih tinggi di pagi hari menyebabkan pestisida yang disemprotkan mungkin tidak mengalami penguapan sebesar pada siang hari. Keadaan ini dapat mengurangi potensi penyimpangan semprotan yang mengakibatkan pajanan inhalasi yang tidak perlu dan oleh karena itu berdampak baik untuk perlindungan pribadi.¹³²

5.3 Markah Efek Pajanan pada Parameter Terkait Tiroid Penyemprot CPF

5.3.1 Faktor yang Berkontribusi terhadap TSH

Kelenjar tiroid yang menghasilkan hormon tiroid (HT) memiliki peran penting dalam tubuh manusia, karena terlibat dalam banyak aktivitas fisiologis dan bekerja pada hampir semua jaringan tubuh termasuk peran utamanya dalam metabolisme dan tumbuh kembang.^{133,134} Sekitar 11% dari populasi orang dewasa mengalami disfungsi tiroid subklinis, membuatnya menjadi masalah kesehatan masyarakat yang bermakna bagi masyarakat global.^{135,136} Berkenaan dengan potensi gangguan endokrin oleh CPF pada fungsi tiroid, meskipun hubungan yang tepat masih kontroversial, sejumlah studi epidemiologi telah melaporkan beberapa bukti dampak potensial pajanan OP pada fungsi tiroid.^{89,137,138}

Dalam studi ini, terdapat sejumlah faktor yang berkontribusi terhadap konsentrasi TSH yaitu DPK, hari setelah aplikasi, EYU, rasio Tg/FT4, dan FT4. DPK yang lebih tinggi dikaitkan dengan konsentrasi TSH yang lebih tinggi yang memberikan bukti bahwa petani terpajan dengan zat yang berpotensi mengganggu tiroid. Rerata atau median konsentrasi TSH pada subjek penelitian ini masih berada dalam rentang nilai normal. Meskipun TSH dianggap sebagai biomarker utama untuk mengevaluasi fungsi tiroid, namun konsentrasi yang berada dalam rentang nilai normal tidak serta merta menunjukkan status hormon dalam jaringan tertentu.⁶⁶ Proporsi konsentrasi TSH abnormal dalam populasi penelitian ini sedikit lebih rendah daripada di antara petani di Thailand.¹³⁹ Namun, penelitian ini menunjukkan bahwa semua subjek dengan konsentrasi TSH abnormal berada pada kelompok

DPK tinggi dan median konsentrasi TSH secara bermakna lebih tinggi di antara kelompok DPK tinggi dibandingkan DPK rendah.

Jumlah hari setelah penyemprotan berhubungan positif dengan konsentrasi TSH. Kondisi ini mungkin menunjukkan bahwa petani terkena pajanan pestisida pada tingkat tertentu yang lebih berpotensi menyebabkan efek kronik atau kumulatif daripada efek akut pada tiroid. Di sisi lain, kadar EYU berhubungan negatif dengan konsentrasi TSH pada subjek penelitian. Pemeriksaan EYU merupakan salah satu parameter yang dipergunakan secara luas untuk menilai kecukupan asupan yodium pada populasi. Yodium merupakan salah satu komponen penting dalam sintesis hormon tiroid dan pada orang dewasa sebagian besar yodium yang dikonsumsi akan diekskresikan melalui urin. Oleh sebab itu, median konsentrasi EYU dapat merefleksikan kecukupan asupan yodium pada populasi penelitian ini. Peningkatan konsentrasi TSH dalam keadaan asupan yodium yang rendah merupakan salah satu mekanisme adaptasi terhadap defisiensi yodium. Defisiensi yodium yang diindikasikan dengan $EYU < 100 \mu\text{g/L}$ diketahui berhubungan dengan peningkatan konsentrasi TSH dan sebaliknya kelebihan asupan yodium berlebihan berhubungan dengan penurunan TSH pada populasi.^{140,141}

Rasio Tg/FT4 berhubungan dengan konsentrasi TSH dalam model regresi akhir. Nilai median rasio Tg/FT4 sebesar 7,33 pada kelompok DPK tinggi secara bermakna lebih tinggi dibandingkan dengan median 5,02 pada kelompok DPK rendah yang mengindikasikan bahwa pada kelompok DPK tinggi mengalami ketidakseimbangan hormonal yang lebih tinggi. Temuan ini ditunjang dengan fakta bahwa walaupun tidak didapatkan perbedaan konsentrasi FT4 berdasarkan DPK, namun konsentrasi FT4 pada subjek penelitian berhubungan negatif dengan TSH, memberikan bukti terjadinya mekanisme umpan balik yang disebabkan oleh kadar hormon tiroid yang beredar dalam sirkulasi.

Subjek penelitian ini merupakan petani yang menggunakan CPF selama kegiatan pertanian, namun, 94% di antaranya menggunakan pestisida lain sebagai campuran bagi CPF. Kondisi ini serupa dengan praktik penggunaan pestisida gabungan pada petani di negara lain.^{85,114} Ditemukannya nilai median TSH yang lebih tinggi pada subjek yang menggunakan ≤ 3 pestisida membuka kemungkinan mengenai dampak

yang ditimbulkan oleh interaksi kombinasi pestisida yang digunakan. Akan tetapi, analisis pada penggunaan kombinasi CPF dengan pestisida kelas IB atau karbamat atau difenokonazol maupun piretroid ternyata tidak menunjukkan hubungan yang bermakna terhadap fungsi tiroid subjek. Dengan menggunakan asumsi bahwa semakin sedikit pestisida tambahan yang digunakan oleh petani akan diikuti oleh peningkatan jumlah CPF yang digunakan sebagai agen utama untuk mengendalikan hama, mungkin dapat menjelaskan sebagian keadaan petani yang menggunakan ≤ 3 pestisida dan memiliki konsentrasi TSH yang lebih tinggi, namun tidak dapat dijelaskan dengan keberadaan kombinasi pestisidanya.

Walaupun hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kombinasi pestisida tidak berhubungan dengan fungsi tiroid, namun tidak serta merta dapat memastikan bahwa CPF adalah satu-satunya agen yang memengaruhi fungsi tiroid pada subjek penelitian. Kenyataan bahwa proporsi penggunaan EBDC mancozeb yang memiliki efek inhibisi TPO cukup tinggi pada subjek penelitian dan kecenderungan untuk menggunakan pestisida gabungan yang kompleks dalam praktik pertanian membuat hampir tidak mungkin untuk menentukan satu pestisida atau kelas tertentu sebagai agen penyebab gangguan tiroid. Hal ini disebabkan oleh beberapa mekanisme aksi yang terlibat dan fakta bahwa setiap bahan kimia dapat berinteraksi satu sama lain menghasilkan interaksi dosis-respons yang kompleks,¹⁴² dan interaksi tersebut belum dapat dibuktikan melalui penelitian ini.

Setengah dari subjek penelitian memiliki kebiasaan merokok. Walaupun kebiasaan merokok telah diketahui berkaitan dengan sejumlah masalah kesehatan, namun mekanisme pasti hubungan antara kebiasaan merokok dengan tiroid masih belum diketahui sehingga membutuhkan penelitian lebih lanjut. Dalam studi ini tidak didapatkan hubungan antara kebiasaan merokok dengan TSH, namun studi terdahulu melaporkan adanya perubahan fungsi tiroid akibat rokok sebagai akibat inhibisi tiroid peroksidase (TPO).¹⁴³ Karena merokok selama penyemprotan pestisida adalah praktik umum di lingkungan pertanian,^{144,145} potensi pajanan pestisida secara oral juga dapat terjadi jika tangan yang terkontaminasi tidak dicuci dengan benar sebelum melakukan aktivitas tersebut, menjadikannya faktor risiko yang penting dalam hubungannya dengan pajanan pestisida.

5.3.2 Disrupsi Tiroid

Sejumlah studi epidemiologi mengenai dampak pajanan pestisida pada tiroid yang dipublikasikan sejauh ini menyebutkan pajanan pestisida menurunkan hormon tiroid dalam sirkulasi dan meningkatkan konsentrasi TSH. Didapatkan bukti bahwa peningkatan hormon TSH dan penurunan T3 terkait dengan peningkatan total metabolit OP.⁸⁴ Studi lain melaporkan hubungan antara TCPy yang merupakan metabolit spesifik CPF terhadap peningkatan kadar TSH dan juga diduga terdapat hubungan negatif antara kadar TCPy dengan FT4.^{83,146} Di antara pria dewasa yang melakukan aktivitas penyemprotan pestisida, pajanan OP dan organoklorin mungkin menyebabkan penurunan kadar hormon serum T3 dan T4 serta peningkatan kadar TSH.⁸⁹ Kondisi serupa ditemukan dalam penelitian lain yang menunjukkan fungsi tiroid, terutama pada pria, dipengaruhi oleh pajanan kumulatif pestisida pertanian maupun pajanan terkini di tempat kerjanya dan mengakibatkan peningkatan TSH disertai dengan penurunan FT4.¹⁸ Lamanya penggunaan pestisida juga diketahui berhubungan dengan peningkatan TSH pada laki-laki penyemprot pestisida dalam *Agricultural Health Study*.¹⁴⁷

Selain itu, penelitian pada hewan coba menunjukkan bahwa CPF berhubungan dengan gangguan tiroid. Secara *in-vivo*, sebuah penelitian pada tikus melaporkan bahwa CPF dapat menginduksi perubahan tiroid dengan penurunan kadar T4 dan peningkatan ukuran sel.¹⁵ Penelitian lain menunjukkan hasil yang serupa dengan penurunan serum T3 dan T4 dan peningkatan TSH yang diduga dikaitkan dengan kerusakan struktural oleh CPF pada jaringan tiroid.¹⁴⁸ Kerusakan folikel tiroid yang dikaitkan dengan pajanan CPF juga dilaporkan oleh beberapa studi lain.^{149,150} Kemungkinan mekanisme penyebab kerusakan jaringan tiroid akibat pajanan CPF diduga melalui pembentukan radikal bebas atau *reactive oxygen species* (ROS) yang menginduksi terjadinya stress oksidatif dan kerusakan kronik pada jaringan tiroid dengan akibat menurunnya produksi hormon tiroid. Bukti terjadinya stress oksidatif ditunjukkan dengan meningkatnya kadar malondialdehid (MDA) yang merupakan markah peroksidase lipid pada jaringan tiroid setelah pemberian CPF dan sebaliknya terjadi penurunan kadar MDA setelah pemberian antioksidan.^{148,150}

Tahapan biosintesis hormon tiroid dan sekresi tiroglobulin sangat bergantung pada TSH, oleh karena itu konsentrasi tiroglobulin akan meningkat mengikuti stimulasi

TSH selama sintesis hormon tiroid.⁶⁶ Sintesis hormon tiroid juga membutuhkan peran besar dari enzim tiroid peroksidase (TPO) dalam proses organifikasi dan *coupling*. Dimulai dengan sekresi TSH oleh hipofisis anterior sebagai respons terhadap umpan balik dari konsentrasi hormon tiroid dalam sirkulasi yang selanjutnya merangsang kelenjar tiroid untuk memproduksi hormon tiroid. TSH yang berikatan dengan reseptor TSH mengatur ambilan iodida sehingga iodinasi tirosin pada tiroglobulin, suatu glikoprotein besar yang berfungsi sebagai penyimpan iodida dan berperan penting dalam hormonogenesis tiroid, dapat dimulai dan diikuti oleh serangkaian langkah sintesis hormon tiroid.^{68,69,151}

Di antara sejumlah kondisi yang dapat menyebabkan gangguan pada tiroid, kejadian tiroiditis autoimun merupakan salah satu penyebab penting kejadian hipotiroid. Terjadinya peradangan kronik yang mengarah pada kerusakan kelenjar tiroid secara bertahap dan progresif menyebabkan kelenjar tiroid tidak mampu menyintesis hormon tiroid yang cukup untuk memenuhi kebutuhan jaringan perifer.⁷⁷ Salah satu penanda penyakit tiroid autoimun adalah ditemukannya antibodi TPO yang berefek pada inhibisi TPO dalam sintesis hormon tiroid.⁷⁸ Dalam studi ini tidak dilakukan pemeriksaan antibodi TPO untuk melihat secara objektif kemungkinan kejadian tiroiditis autoimun pada subjek penelitian, sehingga peran antibodi TPO terhadap disrupsi tiroid pada penyemprot pestisida CPF belum dapat disingkirkan.

Pada penelitian ini, kadar TSH kelompok DPK tinggi lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok DPK rendah. Konsentrasi FT4 berhubungan negatif terhadap TSH, sebaliknya rasio Tg/FT4 berhubungan positif dengan TSH. Hal tersebut memunculkan pendapat bahwa kerusakan folikel tiroid akibat pajanan CPF memberi pengaruh negatif yang lebih besar kepada jalur sintesis hormon dibandingkan pada sintesis tiroglobulin. Menggunakan argumentasi bahwa CPF menyebabkan kerusakan pada epitelial folikel tiroid, maka dapat dimengerti bahwa proses sintesis hormon tiroid dan sintesis tiroglobulin tidak dapat berlangsung dengan optimal pada folikel tiroid yang mengalami degenerasi, deskuamasi, dan obliterasi lumen koloidal. Gangguan dalam proses sintesis hormon tiroid ini mengakibatkan berkurangnya hormon tiroid yang dihasilkan dan memicu terjadinya mekanisme umpan balik, mengakibatkan peningkatan sekresi TSH oleh

hipofisis. Peningkatan TSH memulai proses sintesis hormon tiroid sekaligus menstimulasi sintesis tiroglobulin yang berperan sebagai bahan baku produksi hormon. Oleh karenanya, kadar TSH yang meningkat dan perbandingan kadar tiroglobulin terhadap kadar FT4 dianggap berpotensi menjadi faktor yang menggambarkan disrupsi fungsi tiroid akibat pajanan CPF. Fenomena tersebut teramati dalam penelitian saat ini yang sekaligus memberikan penjelasan bahwa rasio Tg/FT4 merupakan faktor utama yang berkontribusi pada kadar TSH dalam model akhir analisis regresi linier ganda.

5.3.3 Interaksi Faktor yang Berkontribusi terhadap Disrupsi Tiroid

Melalui model analisis jalur, dampak pajanan CPF pada fungsi tiroid subjek penelitian dapat dianalisis dalam 1 rangkaian dengan berlandaskan penjelasan dalam bagian 5.3, 5.4, dan 5.5. Peran markah kerentanan, besarnya pajanan dan efek yang ditimbulkan tergambarkan dalam model akhir analisis jalur pada Gambar 4.3. CYP2B6*6 memberikan efek negatif terhadap kadar TCPy yang berarti subjek dengan variasi genetik CYP2B6*6 akan memiliki kadar TCPy yang lebih rendah yang sekaligus dapat menggambarkan tingkat pajanan yang lebih rendah. AChE di sisi lain menerima efek negatif dari DPK, sehingga subjek dengan DPK tinggi akan mengalami inhibisi AChE lebih besar dengan akibat aktivitas AChE yang lebih rendah. Model ini menjelaskan peran sentral DPK terhadap dampak pada fungsi tiroid penyemprot pestisida dengan pajanan utama CPF. DPK memberikan efek langsung terhadap rasio Tg/FT4 yang merupakan faktor utama dengan efek terbesar terhadap TSH. Efek total DPK terhadap TSH sebesar 0,28, yang merupakan efek sedang, bersama dengan efek langsung rasio Tg/FT4 sebesar 0,49 menjelaskan 30,7% varian TSH pada subjek.

Nilai median EYU sebesar 173,5 µg/L pada populasi penelitian memberikan bukti bahwa populasi penelitian memperoleh asupan yodium yang adekuat. Sehingga, tidak didapatkannya efek EYU terhadap TSH dalam model analisis jalur menunjukkan bahwa terdapat faktor lain yang berperan lebih besar dalam menimbulkan efek terhadap TSH.

Kadar TCPy dalam analisis jalur dipengaruhi oleh efek CYP2B6 namun tidak oleh DPK. TCPy merupakan metabolit spesifik pajanan CPF dan oleh karena itu terdeteksinya TCPy membuktikan bahwa pajanan benar terjadi dan kadarnya

menunjukkan dosis internal sebagai hasil metabolisme CPF yang selain dipengaruhi oleh CYP2B6 juga oleh sejumlah faktor lainnya. Sebaliknya, DPK merupakan estimasi besarnya pajanan (dosis eksternal) dan tidak secara langsung mengkuantifikasi besarnya konsentrasi pajanan yang diterima petani. Kondisi tersebut menjelaskan tidak didapatkannya efek langsung DPK terhadap TCPy.

Potensi bahwa CPF memengaruhi keseimbangan hormonal melalui mekanisme kerusakan pada folikel tiroid sehingga menyebabkan terganggunya proses sintesis tiroglobulin dan sintesis hormon tiroid telah disampaikan pada bagian sebelumnya. Alternatif lain yang diperoleh dalam analisis jalur adalah bahwa pajanan CPF memiliki efek positif terhadap kadar TSH. Efek ini ditunjukkan dengan hubungan positif yang bermakna antara dosis pajanan kumulatif CPF dengan kadar TSH baik melalui efek langsung maupun tidak langsung.

Pajanan CPF sebagai inhibitor AChE diduga memiliki efek langsung terhadap sekresi *corticotropin releasing hormone* (CRH) yang disebabkan oleh stimulasi kolinergik akibat akumulasi asetilkolin.⁹⁵ Selain melalui mekanisme umpan balik pada hipofisis anterior, sekresi TSH juga dapat distimulasi oleh CRH melalui proses yang dimediasi oleh reseptor CRH-R2 pada hipofisis.⁹⁵ Stimulasi kolinergik yang terjadi pada tingkat kelenjar tiroid diduga juga berhubungan dengan inhibisi pelepasan hormon tiroid yang diinduksi oleh TSH, menyebabkan penurunan kadar hormon di sirkulasi. Walaupun dalam analisis jalur tidak didapatkan hubungan bermakna antara aktivitas AChE terhadap TSH, namun adanya bukti tidak langsung berupa hubungan dosis-respons AChE terhadap DPK dan DPK yang berhubungan positif dengan TSH dapat menjelaskan sebagian kemungkinan penyebab meningkatnya kadar TSH akibat pajanan CPF.

Serupa dengan bahan xenobiotik lain yang bersifat lipofilik, CPF memiliki kemampuan untuk merusak integritas dan menembus sawar darah otak.¹⁵² Didapatkannya efek langsung DPK terhadap TSH pada model analisis jalur menimbulkan dugaan mengenai kemungkinan mekanisme terjadinya disrupsi tiroid pada tingkat yang lebih tinggi yaitu fungsi regulasi hormon tiroid di hipofisis dan hipotalamus. Pestisida umumnya tidak memiliki tingkat kemiripan struktural yang tinggi dengan hormon tiroid, oleh karena itu studi mengenai inhibisi pestisida

khususnya CPF pada reseptor hormon tiroid masih sangat terbatas dibandingkan dengan xenobiotik lain seperti *polychlorinated biphenyls* (PCBs).¹⁵³ Sebuah studi mengungkap mekanisme interaksi antara DEP, metabolit non-spesifik OP, dengan hormon tiroid pada tingkat molekuler secara *in silico*. Studi ini menunjukkan kemungkinan pengaruh DEP pada sistem transduksi sinyal dan fungsi regulasi hormon tiroid yang menyebabkan gangguan pada biosintesis, ikatan reseptor dan regulasi sinyal hormon tiroid.⁹⁶ Studi lain menyebutkan bahwa CPF dan CPF-O menunjukkan afinitas ikatan yang tinggi dengan reseptor estrogen sehingga dapat menghambat *estrogen binding and signalling function*.¹⁵⁴ Kelompok peneliti yang sama juga mendapati bahwa CPF dan CPF-O berinteraksi dengan *sex hormone binding globulin* dalam sebuah simulasi *molecular docking*.¹⁵⁵

Sebagian mekanisme efek langsung DPK terhadap TSH mungkin dapat dijelaskan melalui analogi hasil studi di atas, yaitu bahwa CPF dapat berikatan dengan reseptor hormon tiroid menyebabkan tidak adekuatnya ambilan hormon tiroid pada organ sehingga menciptakan kondisi menyerupai hipotiroid. Bila kondisi yang menyerupai hipotiroid itu terjadi di hipofisis, maka TSH akan disekresi untuk menstimulasi sintesis hormon tiroid. Di sisi lain, apabila kondisi menyerupai hipotiroid juga terjadi di hipotalamus, TRH akan disekresi untuk meningkatkan sekresi TSH oleh hipofisis sebagai mekanisme kompensasi. Oleh karena bukti ilmiah yang menjelaskan mekanisme disrupsi tiroid akibat pajanan CPF, terutama terkait dengan inhibisi reseptor hormon tiroid dan sistem transduksi sinyal masih sangat terbatas, maka diperlukan studi lanjut untuk membuktikan usulan mekanisme ini.

5.4 Implikasi Hasil Penelitian

Kebutuhan akan penggunaan pestisida kimia, khususnya insektisida CPF oleh petani merupakan hal yang tidak dapat dihindarkan. Penelitian ini telah mengidentifikasi karakteristik pajanan yang dialami oleh petani dan sekaligus menyajikan bukti terjadinya disrupsi fungsi tiroid pada penyemprot pestisida dengan pajanan utama CPF dan faktor yang berkontribusi di dalamnya. Berawal dari kondisi tersebut, maka implikasi penelitian ini akan menitikberatkan pada upaya pengelolaan kesehatan petani penyemprot pestisida menggunakan pendekatan berbasis pencegahan di antaranya melalui upaya pengendalian pajanan,

diikuti oleh monitoring biologis terhadap pajanan, deteksi dini masalah kesehatan pada pekerja, dan identifikasi kerentanan individu. Sejalan dengan hal itu, upaya deteksi dini dan penegakan etiognosis gangguan kesehatan akibat CPF dapat dilakukan. Berikut adalah butir-butir penjelasan atas implikasi penelitian ini:

1. Setiap upaya pengendalian pajanan untuk menurunkan dosis pajanan CPF pada petani melalui sejumlah langkah yang menyeluruh dapat mencegah dan menurunkan risiko kejadian gangguan kesehatan akibat pajanan CPF, yang secara khusus akan berdampak langsung terhadap keseimbangan hormonal dan fungsi tiroid. Pengendalian pajanan dapat dilakukan melalui tindakan pencegahan yang komprehensif yaitu memberikan pengetahuan dan pemahaman yang tepat tentang potensi dampak kesehatan akibat pajanan pestisida, pelatihan tentang pemilihan, penggunaan dan penanganan pestisida serta penggunaan APD yang tepat. Penggunaan pakaian lengan panjang dan celana panjang saat melakukan penyemprotan pestisida merupakan salah satu contoh upaya sederhana yang mampu laksana bagi para petani dan dalam studi ini berhubungan dengan DPK yang lebih rendah.
2. Kerentanan genetik akibat keberadaan variasi genetik CYP2B6 dapat bermanfaat dalam strategi pengendalian pajanan dan penegakan etiognosis pada individu terpajan CPF. Studi ini menunjukkan bahwa individu dengan genotipe CYP2B6*1/*1 mungkin lebih rentan terhadap toksisitas CPF, sehingga berpotensi menjadikan polimorfisme CYP2B6 sebagai biomarker kerentanan pajanan CPF yang selanjutnya akan berguna dalam strategi manajemen pajanan pada populasi pertanian yang rentan.
3. Monitoring biologis terhadap pajanan pestisida khususnya CPF dapat dilakukan terhadap AChE eritrosit dan TCPy urin. Pemeriksaan kesehatan pra-kerja, berkala maupun pemeriksaan kesehatan khusus yang selama ini belum menyentuh pekerja sektor pertanian skala kecil juga perlu memperoleh perhatian serius untuk diimplementasikan. Dalam kaitannya dengan potensi efek terhadap tiroid dan mengingat bahwa gangguan tiroid secara klinis mungkin belum ditemukan, maka pemeriksaan terhadap parameter tiroid minimal TSH dan FT4 serta bila memungkinkan secara finansial pemeriksaan rasio Tg/FT4 perlu dilakukan dan diinterpretasi dengan penuh kehati-hatian.

Terlepas dari belum tersedianya nilai referensi untuk rasio Tg/FT4, perbandingan tersebut dapat bermanfaat dalam rangka deteksi dini disrupsi fungsi tiroid akibat CPF manakala kadar TSH masih dalam batas normal.

4. Penegakan etiognosis gangguan kesehatan akibat pajanan CPF khususnya pada tiroid dilakukan dengan menggunakan pendekatan 7 langkah diagnosis okupasi yang terdiri atas penegakan diagnosis klinis, melakukan identifikasi bahaya potensial yang dialami, mencari bukti ilmiah keterkaitan diagnosis klinis dengan bahaya potensial, melakukan estimasi dosis pajanan, mengidentifikasi faktor risiko individu dan faktor risiko lain di luar pekerjaan utama dan langkah terakhir adalah menegakkan diagnosis okupasi. Pemeriksaan skrining untuk mengetahui status variasi genetik CYP2B6 merupakan bagian dari langkah identifikasi faktor risiko individu yang dapat membantu memetakan potensi risiko adanya kerentanan genetik yang berimplikasi pada peningkatan dampak pajanan pada individu yang terpajan CPF. Demikian pula halnya dengan pemeriksaan kesehatan berkala dan khusus yang bila dilakukan dengan baik akan bermanfaat dalam rangka deteksi dini gangguan kesehatan pada petani penyemprot pestisida. Oleh karenanya, pemeriksaan terhadap variasi genetik CYP2B6 bersama dengan pemeriksaan kesehatan berkala maupun khusus berperan penting dalam penegakan etiognosis tersebut.

5.5 Keterbatasan dan Kekuatan Penelitian

Studi ini memiliki beberapa keterbatasan sebagai berikut:

1. Jumlah aktual CPF atau komposisi campuran yang digunakan tidak diukur secara langsung dan analisis terhadap kombinasi pestisida yang digunakan tidak dilakukan dalam penelitian ini.
2. Berkaitan dengan kegiatan pertanian, dengan semua informasi yang diperoleh dilaporkan sendiri oleh petani, kesalahan secara acak atas perkiraan besar pajanan dan klasifikasi pajanan sangat mungkin terjadi. Oleh karena itu, untuk membatasi kemungkinan kesalahan klasifikasi, beberapa pertanyaan ditanyakan kembali secara acak untuk menentukan konsistensi jawaban.
3. Pajanan CPF juga dapat berasal dari mengonsumsi makanan atau minuman yang terkontaminasi, selain itu diketahui bahwa makanan tertentu dapat memengaruhi kadar yodium yang penting dalam biosintesis tiroid, namun informasi asupan makanan tidak dikumpulkan.

4. Meskipun peserta diminta untuk mengikuti tahap kedua dalam waktu yang ditentukan, yaitu 1 hari setelah kegiatan penyemprotan, karena alasan tertentu mereka hadir sesuai dengan waktu luangnya, sehingga dapat memengaruhi konsentrasi metabolit yang terdeteksi.
5. Tidak dilakukan konfirmasi karakteristik genotip varian SNP sehingga individu yang merupakan pembawa alel CYP2B6 785A>G dan 516G>T dapat menjadi heterozigot CYP2B6 *1/*6 atau *compound heterozygote* *4/*9.
6. Terlepas dari potensi interaksi yang kompleks dalam pestisida gabungan yang digunakan oleh petani, desain potong lintang yang digunakan menjadikan hubungan sebab akibat antara pajanan CPF dan disrupsi tiroid tidak dapat dikonfirmasi berdasarkan hubungan temporal.

Terlepas dari sejumlah keterbatasan di atas, penelitian ini juga memiliki beberapa kekuatan yaitu:

1. Besar sampel (peserta) dalam penelitian ini sesuai dengan yang direncanakan dan memberikan *power* penelitian yang kuat sebesar 93%.
2. Penelitian ini melakukan analisis secara komprehensif terhadap ketiga kelompok markah yaitu penanda pajanan CPF, kerentanan (CYP2B6, CYP2C19) dan penanda efek berupa parameter fungsi tiroid yaitu, TSH, FT4 dan tiroglobulin yang merupakan penanda penting dalam sintesis hormon tiroid untuk menilai perubahan fungsi tiroid. Sejauh pengetahuan peneliti, ini adalah laporan pertama mengenai frekuensi distribusi polimorfisme gen CYP2B6*6 dalam kaitannya dengan konsentrasi TCPy pada populasi pertanian Indonesia.
3. Penelitian ini menggunakan metode kuantitatif tervalidasi untuk estimasi DPK yang didukung oleh informasi rinci tentang karakteristik pekerjaan terpajan pestisida

BAB 6

SIMPULAN DAN SARAN

6.1 Simpulan

1. Karakteristik penyemprot pestisida dengan pajanan utama CPF adalah tingginya proporsi praktik penggunaan pestisida gabungan dengan kekerapan kontak langsung terhadap pestisida, rendahnya frekuensi penggunaan APD, disertai tingginya volume pestisida yang disemprotkan dan lahan olahan yang luas.
2. Dosis pajanan kumulatif pada penyemprot pestisida dengan pajanan utama CPF berpengaruh positif terhadap TCPy, sebaliknya DPK berpengaruh negatif terhadap aktivitas AChE, menunjukkan hubungan dosis-respons akibat pajanan CPF.
3. Variasi genetik CYP2B6*6 memengaruhi kadar TCPy berupa kadar lebih rendah pada penyemprot pestisida dengan pajanan utama CPF, menunjukkan potensi variasi genetik CYP2B6*6 sebagai markah kerentanan pajanan CPF. Kadar TCPy tidak dipengaruhi oleh variasi genetik CYP2C19*2 dan *3.
4. Dosis pajanan kumulatif pada penyemprot pestisida dengan pajanan utama CPF berpengaruh positif terhadap kadar TSH dan rasio tiroglobulin/FT4, menunjukkan ketidakseimbangan hormonal sebagai indikator terjadinya disrupsi pada fungsi tiroid.
5. Konsentrasi TSH pada penyemprot pestisida dengan pajanan utama CPF dipengaruhi oleh interaksi rasio tiroglobulin/FT4, DPK, kadar TCPy, aktivitas AChE eritrosit, dan variasi genetik CYP2B6*6, menunjukkan hubungan dosis-respons pada terjadinya disrupsi tiroid. Variasi genetik CYP2C19*2 dan *3, PON-1 dan FT4 tidak memberikan efek dalam interaksinya terhadap konsentrasi TSH.

6.2 Saran

6.2.1 Untuk Praktik Pertanian

Perlu dilakukan program edukasi berkesinambungan bagi petani penyemprot pestisida mengenai praktik kerja aman selama menangani pestisida di antaranya melalui praktik penggunaan pestisida sesuai aturan pakai, menggunakan alat pelindung diri yang sesuai untuk bekerja dengan pestisida, mengenakan pakaian kerja lengan panjang dan celana panjang saat menyemprot pestisida, melakukan

upaya kebersihan diri dengan segera cuci tangan, mandi dan mengganti pakaian setelah terpajan pestisida, serta mempraktikkan gaya hidup sehat.

6.2.2 Untuk Penyusunan Kebijakan

- Pemerintah perlu menyelenggarakan program edukasi kolaboratif lintas sektor untuk menjawab kebutuhan terhadap upaya pengendalian pajanan pestisida pada petani. Upaya menurunkan besarnya pajanan dapat dilakukan dengan pengendalian administratif melalui pelatihan dan pendampingan tentang pemilihan, penggunaan dan pengelolaan pestisida secara komprehensif yang disertai dengan pengasuhan berkelanjutan perlu diberikan kepada petani pada umumnya dan khususnya pada penyemprot pestisida, serta mendorong penggunaan APD dan pakaian kerja yang memadai. Program ini dapat diselenggarakan dengan keterlibatan sejumlah elemen di antaranya namun tidak terbatas pada pemerintah pusat atau daerah melalui Dinas Pertanian dan Dinas Kesehatan, perangkat desa, dan kelompok tani.
- Kementerian Kesehatan dapat menyediakan informasi berbasis bukti dan memberikan rekomendasi mengenai dampak kesehatan penggunaan pestisida kimia khususnya CPF dalam rangka pembaruan kebijakan penggunaannya pada produk pertanian
- Kementerian Pertanian perlu mengusahakan alternatif metode pengendalian hama yang lebih aman dan memiliki dampak kesehatan yang paling minimal
- Dinas Pertanian dapat berperan dalam menyediakan pedoman praktik kerja aman bagi petani dan mengoptimalkan peran petugas Penyuluh Pertanian Lapangan (PPL) dalam menyelenggarakan program edukasi bagi petani

6.2.3 Untuk Profesi Kedokteran Okupasi

- Upaya pengendalian pajanan melalui pencegahan yang komprehensif berdampak pada menurunnya dosis pajanan CPF yang diterima petani dan diikuti oleh menurunnya dampak pajanan CPF khususnya pada tiroid.
- Sebagai upaya memelihara kesehatan petani dan deteksi dini gangguan kesehatan akibat CPF, penilaian dosis pajanan dan pemeriksaan kesehatan perlu diimplementasikan. Monitoring biologis terhadap pajanan CPF dapat dilakukan terhadap AChE eritrosit dan TCPy urin. Dalam kaitannya dengan

potensi efek terhadap tiroid, dapat dilakukan pemeriksaan terhadap parameter tiroid seperti TSH, FT4 dan rasio Tg/FT4.

- Variasi genetik CYP2B6 dapat bermanfaat dalam memetakan potensi risiko kerentanan genetik dalam kaitannya dengan strategi pengendalian pajanan dan penegakan etiognosis pada individu terpajan CPF.

6.2.4 Untuk Penelitian

- Penggunaan pakaian berlengan panjang dan celana panjang saat menyemprotkan pestisida, rerata volume campuran pestisida yang disemprot dan luas lahan yang diolah menunjukkan hubungan yang bermakna dengan DPK, menjadikannya variabel yang penting untuk diperhitungkan dalam estimasi DPK pada penelitian di masa yang akan datang.
- Penelitian lanjut dengan memperhatikan potensi interaksi penggunaan pestisida kombinasi dan peran status gizi, pola asupan makanan petani, residu pestisida pada pangan sebagai faktor yang penting dalam terjadinya gangguan tiroid pada penyemprot pestisida yang terpajan CPF dapat dilakukan untuk menjawab keterbatasan dalam penelitian ini.
- Penelitian lanjut perlu dilakukan untuk membuktikan peran asetilkolin (ACh) dalam mekanisme terjadinya disrupsi tiroid.
- Studi lanjut diperlukan untuk menjelaskan efek langsung pajanan CPF terhadap disrupsi tiroid, terutama untuk membuktikan mekanisme terkait dengan inhibisi reseptor dan sistem transduksi sinyal hormon tiroid.

RINGKASAN

PENDAHULUAN

Indonesia adalah negara pertanian dan para petani umumnya menggunakan insektisida untuk membasmi hama. Perilaku penggunaan insektisida oleh petani umumnya buruk yaitu konsentrasi lebih dari yang dianjurkan dan frekuensi lebih sering. Klorpirifos (CPF) adalah insektisida yang paling sering digunakan dan berpotensi menimbulkan masalah kesehatan. Toksisitas CPF terjadi melalui serangkaian proses metabolisme di antaranya bioaktivasi menjadi metabolit aktif klorpirifos-okson dan detoksifikasi membentuk metabolit inaktif TCPy. Selain itu, CPF juga berikatan dengan enzim asetilkolinesterase (AChE), sehingga menurunnya aktivitas AChE merupakan salah satu penanda pajanan CPF. Keseimbangan antara reaksi aktivasi dan detoksifikasi klorpirifos dipengaruhi oleh keberadaan bahan xenobiotik lainnya, aktivitas enzim paraoksonase-1 (PON-1) serta aktivitas enzim sitokrom P450 seperti CYP2B6 dan CYP2C19 yang membawa perbedaan terhadap respons individu terhadap xenobiotik.^{9,10}

Pajanan CPF pada penyemprot pestisida yang dinilai dengan dosis pajanan kumulatif (DPK), PON-1, AChE dan TCPy dalam interaksinya bersama variasi genetik CYP2B6, CYP2C19 sebagai penanda kerentanan individu terhadap pajanan CPF dapat menyebabkan disrupsi tiroid. Studi eksperimental menunjukkan perubahan morfologis dan histopatologis pada tiroid hewan coba setelah dipajankan klorpirifos dengan dosis rendah. Menurunnya kadar hormon tiroid akibat pajanan CPF diduga berhubungan dengan kerusakan sel folikular tiroid sehingga proses sintesis hormon tiroid tidak dapat berjalan sempurna. Meskipun demikian, hingga saat ini bukti yang menunjukkan indikasi efek toksik langsung CPF terhadap organ atau jaringan selain sistem saraf masih terbatas dan oleh karenanya mekanisme pasti kerusakan tiroid tersebut belum dimengerti sepenuhnya.^{15,16,90} Studi epidemiologis yang mengaitkan penggunaan klorpirifos dalam kejadian gangguan tiroid pada manusia juga masih sangat terbatas dan inkonklusif.

Dengan demikian penelitian ini dilakukan untuk mengetahui peran PON-1, AChE, dan TCPy sebagai markah pajanan CPF, polimorfisme CYP2B6 dan CYP2C19 sebagai markah kerentanan, serta rasio tiroglobulin/FT4 (Tg/FT4), FT4 dan TSH

sebagai markah efek gangguan tiroid akibat pajanan CPF yang dalam bidang Kedokteran Okupasi akan sangat bermanfaat dalam deteksi dini dan penegakan diagnosis penyakit akibat kerja (PAK) serta upaya pencegahan dan pengendaliannya.

METODE PENELITIAN

Penelitian potong lintang ini dilakukan pada bulan Juli–Oktober 2020. Sebanyak 151 petani bawang putih dan sayuran yang menggunakan CPF minimal 1 tahun di Dusun Pancot dan Desa Adipuro, Jawa Tengah berpartisipasi dalam penelitian ini. Data karakteristik subjek dan estimasi dosis pajanan kumulatif (DPK) diambil dengan wawancara. Tingkat pajanan kumulatif diestimasi menggunakan metode yang tervalidasi dalam *Agricultural Health Study*.⁶³ Selama sesi wawancara, peserta ditanya tentang kegiatan pertanian mereka termasuk durasi kerja harian, lama penggunaan pestisida, jumlah hari penyemprotan dalam setahun, penggunaan APD, kebiasaan kebersihan pribadi, penanganan tumpahan pestisida dan sejumlah karakteristik terkait kegiatan terpajan pestisida.

Pemeriksaan laboratorium rutin dan kimia dalam penelitian ini dilakukan di Prodia Occupational Health Center (OHC) Cikarang. Pemeriksaan kreatinin, SGOT, SGPT diperiksa menggunakan reagen diagnostik pada alat Proline R-910 sesuai metode standar dari pabrikan. Pemeriksaan TSH, FT4 dan tiroglobulin dilakukan dengan metode *Electrochemiluminescence Immunoassay* (ECLIA) menggunakan reagen diagnostik berturut-turut Elecsys TSH, Elecsys FT4 III, dan Elecsys Tg II pada alat Roche Cobas e-411 sesuai protokol pabrikan dan standar pemeriksaan laboratorium.

Pemeriksaan yodium urin (EYU), PON-1, AChE dan TCPy dilakukan oleh Prodia *Industrial Toxicology Laboratory*. Yodium urin diperiksa dengan modifikasi metode CDC 3002.1¹⁰⁰ menggunakan *Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry* (ICP-MS). Pemeriksaan PON-1 dalam serum dilakukan dengan spektrofotometri menggunakan nitrofenol sebagai standar. Larutan standar dan sampel dibaca pada panjang gelombang 405 nm. Aktivitas AChE eritrosit ditentukan secara fotometri dengan metode Ellmann. TCPy urin dideteksi dalam sampel urin sewaktu menggunakan spektrometer massa *triple quadrupole Agilent*

Ultivo (LC-MS-MS Agilent Technologies, Singapura) dengan program perangkat lunak *Mass-hunter* untuk akuisisi dan analisis data. Prosedur ekstraksi dilakukan berdasarkan adaptasi metode Smith et.al.¹⁰¹, sementara prosedur pemisahan (separasi) dan deteksi menggunakan modifikasi prosedur CDC 6103.03.¹⁰² Pemisahan dilakukan berdasarkan prinsip kromatografi menggunakan Agilent *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC Infinity 1260, Jerman). Konsentrasi TCPy yang terdeteksi dikoreksi dengan kreatinin urin.

Pemeriksaan genetik dilakukan di Laboratorium Klinik Prodia. CYP2C19 genotipe *2 dan *3 diperiksa menggunakan prinsip PCR-RFLP. Pada tahap RFLP, hasil PCR ditambahkan enzim restriksi/ endonuklease yang sesuai sehingga akan menghasilkan potongan/ fragmen DNA dengan panjang yang berbeda, yang kemudian diidentifikasi menggunakan gel elektroforesis. Analisis CYP2C19*2 menggunakan enzim restriksi SmaI dan amplifikasi PCR menggunakan *primer forward* 5'-CAGAGCTTGGCATATTGTATC-3' dan *primer reverse* 5'-GTAAACACACA ACTAGTCAATG - 3'. Sementara pada *3 menggunakan *primer forward* 5'-AAATTGTTTCCAATCATTTAGCT-3', *reverse* 5'-ACTTCAGGGCTTGGTCAATA-3' dan enzim restriksi BamHI.

Analisis CYP2B6 – 516G>T (rs3745274) dilakukan dengan menggunakan *primer* TaqMan® SNP Genotyping Assay C___7817765_60 (Applied Biosystems, CA, USA) dan *thermocycler* Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH, Germany). *Master mix* PCR menggunakan TaqMan GTXpress Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA). Reagen yang dipergunakan diperuntukkan hanya bagi penelitian (*research use only*). Genotip ditentukan berdasarkan sinyal fluoresens dari *TaqMan probe* sesuai petunjuk pabrikan. Sebanyak 6 sampel menjalani pemeriksaan DNA sekuensing menggunakan PCR *product* 533bp sebagai bagian dari validasi hasil pemeriksaan di atas. Genotipe CYP2B6 – 785A>G (rs2279343) dianalisis dengan menggunakan metode sekuensing Sanger. Sampel diamplifikasi dengan PCR menggunakan *primer* seperti yang digambarkan dalam studi sebelumnya oleh Zakeri et.al.⁵³ dan menghasilkan produk PCR 640 bp. Seluruh metode sekuensing dikerjakan oleh 1st BASE DNA Sequencing Division, Apical Scientific Sdn Bhd, Selangor, Malaysia.

Analisis statistik dilakukan dengan program SPSS versi 20. Hubungan antara 2 variabel kategorik dianalisis dengan uji *chi-square*, bila syarat uji tersebut tidak terpenuhi maka akan digunakan uji Fischer. Uji Mann-Whitney U dan Kruskal Wallis dilakukan untuk menguji perbedaan variabel berskala numerik berdasarkan karakteristik individu dan okupasi. Frekuensi alel dan genotip diperhitungkan secara langsung. Analisis multivariat untuk mengetahui hubungan faktor-faktor risiko yang paling dominan berkontribusi terhadap fungsi tiroid secara bersamaan dilakukan dengan regresi linier. Faktor-faktor risiko yang diikutsertakan dalam analisis ini adalah yang memiliki nilai $p \leq 0.20$ pada analisis regresi linier sederhana. Faktor yang berkontribusi pada tingkat kemaknaan 0,05 dipertahankan dalam model final yang diperoleh melalui analisis berdasarkan prosedur *stepwise*. Analisis jalur (*Path analysis*) dilakukan dengan program JASP versi 0.14.1 (*University of Amsterdam*) untuk menguji model hubungan kausalitas dari faktor-faktor yang berkontribusi terhadap TSH. Tingkat kepercayaan yang digunakan 95% dan nilai $p \leq 0,05$. Kegiatan pengumpulan data penelitian ini berlangsung dengan Protokol Etik nomor 20-03-0336 dan memperoleh Surat Keterangan Lolos Kaji Etik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia nomor KET-339/UN2.F1/ETIK/PPM.00.02/2020 tanggal 23 Maret 2020.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Seluruh subjek yang memenuhi syarat dan bersedia berpartisipasi dalam penelitian ini sejumlah 180 orang anggota kelompok tani dan 15 orang peserta tani mandiri diikutsertakan sebagai subjek penelitian. Pada tahap 1, subjek menjalani skrining melalui wawancara, pemeriksaan fisik dan pemeriksaan laboratorium SGOT, SGPT, kreatinin, dan ekskresi yodium urin (EYU). Subjek yang tidak hadir di tahap 2, tidak memperoleh penjelasan mengenai hasil skrining sehingga dianggap mengundurkan diri. Sebanyak 24 subjek dengan hasil pemeriksaan ekskresi yodium urin (EYU) $< 50 \mu\text{g/L}$, atau mengalami gangguan ginjal, atau memutuskan tidak ingin melanjutkan pemeriksaan, atau tidak melengkapi konfirmasi atas riwayat medis dan okupasinya tidak diikutsertakan pada pemeriksaan lanjutan. Karena keterbatasan jumlah sampel urin yang tersedia, hanya 132 subjek dengan hasil pemeriksaan TCPy yang dapat dikoreksi dengan kreatinin urin.

Subjek penelitian berusia 50 (Simpang baku - SB 9,4) tahun, 91% laki-laki, 93% merupakan anggota kelompok tani dan 87% berpendidikan rendah (tidak menyelesaikan wajib belajar 12 tahun) dengan 10 subjek di antaranya tidak pernah menjalani pendidikan formal. Proporsi perokok pada subjek penelitian sebesar 48%. Rerata (SB) dan median (minimum-maksimum) dosis pajanan kumulatif (DPK) pada subjek penelitian berturut-turut adalah 32,44 (SB 24,78) dan 25,95 (0,40–136,58) yang diperoleh dari estimasi berdasarkan hasil perkalian antara *intensity level* (IL), pengalaman usaha tani dan jumlah hari aplikasi per tahun. Subjek diklasifikasikan menjadi kelompok DPK tinggi dan rendah berdasarkan titik potong nilai median tersebut.

Sebagian besar subjek penelitian melaporkan adanya kontak langsung maupun terpercik atau terkena tumpahan pestisida dalam aktivitas pertanian yang dilakukan. Sementara itu, proporsi penggunaan APD yang baik dalam populasi penelitian ini hanya 2% sedangkan proporsi petani yang tidak menggunakan APD sama sekali adalah 15% yang dapat menggambarkan risiko petani terhadap potensi dampak kesehatan akibat pajanan pestisida. APD yang paling sering digunakan dalam populasi penelitian ini adalah masker dan sepatu bot yang pada umumnya tidak memberikan perlindungan yang cukup terhadap pajanan CPF. Namun, peneliti juga menemukan bahwa pemakaian pakaian lengan panjang dan celana panjang saat menyemprot pestisida berhubungan dengan DPK. Temuan ini relevan untuk mengurangi dosis pajanan karena pakaian lengan panjang dan celana panjang memberikan penghalang parsial terhadap kontak langsung karena percikan atau tumpahan.^{112,113}

Hanya 2% petani yang menggunakan pestisida sesuai petunjuk penggunaan. Petani menyemprotkan pestisida dengan median frekuensi 104 hari per tahun, menyebabkan dosis pajanan yang lebih besar akan diterima oleh petani. Mengenai penggunaan pestisida gabungan, 94% dari subjek melaporkan penggunaan dua atau lebih pestisida sebagai campuran dalam satu kesempatan penyemprotan. Hampir separuh dari subjek menggunakan insektisida tambahan berbahan aktif abamektin atau beta siflutrin atau metomil. Ketiga bahan aktif insektisida ini tergolong dalam kelas Ib menurut klasifikasi WHO yang menunjukkan potensi toksisitas akut yang lebih besar. Walaupun tidak ditemukan keterkaitan antara

penggunaan insektisida tambahan ini dengan markah pajanan maupun efek pada tiroid, namun penggunaan pestisida gabungan oleh subjek harus tetap menjadi perhatian mengingat potensi interaksi dari campuran yang digunakan dan kemungkinan toksisitas akut akibat penggunaan yang tidak aman.

Median (minimum–maksimum) hasil pengukuran markah pajanan CPF yaitu PON-1, aktivitas AChE dan TCPy berturut-turut adalah 120,93 (49,55–196,57) mol/L, 8,03 (4,15–14,13) U/g hematokrit, dan 2,31 (0,17–49,12) µg/g kreatinin. Paraoksonase-1 berperan dalam proses detoksifikasi CPF-O yang dihasilkan dari metabolisme fase 1 klorpirifos dalam liver menjadi *diethylphosphate* (DEP) dan *3,5,6-trichloro-2-pyridinol* (TCPy).³⁸ Tidak didapatkan perbedaan kadar PON-1 yang bermakna pada sejumlah variabel kegiatan terpajan pestisida. Tidak didapatkannya efek pajanan CPF terhadap kadar PON-1 dalam penelitian ini mungkin terjadi karena proses metabolisme CPF juga melibatkan sejumlah enzim di antaranya karboksilesterase, butirilkolinesterase, dan CYP serta kemungkinan polimorfisme genetik yang terjadi pada gen PON-1. Aktivitas AChE pada subjek penelitian berhubungan dengan DPK, umur, hari setelah aplikasi pestisida dan kadar TCPy. Aktivitas AChE eritrosit pada subjek dengan DPK tinggi secara bermakna lebih rendah dibandingkan dengan kelompok DPK rendah ($p < 0,001$). Hal ini memberikan gambaran bahwa subjek terpajan dengan bahan yang memiliki potensi inhibisi terhadap aktivitas AChE, di antaranya adalah CPF.^{30,31}

Frekuensi genotip CYP2B6 adalah *1/*1 (32 %); *1/*6 (50 %); dan *6/*6 (18 %), sementara frekuensi genotip CYP2C19 *1/*1, *1/*3, *1/*2, dan *2/*2 berturut-turut adalah 64 %, 7 %, 23 % dan 6 %. Variasi genetik CYP2B6*6 berhubungan dengan TCPy yang lebih rendah dibanding *wild-type* ($p = 0,005$). Kadar TCPy tertinggi berada pada kelompok *1/*1 dan secara bermakna berbeda dengan kelompok *1/*6 maupun *6/*6. Analisis *post-hoc* menggunakan uji *Mann-Whitney U* antara *1/*1 dengan *1/*6 dan *6/*6 menunjukkan perbedaan berturut-turut pada $p = 0,039$ dan $p = 0,002$. CYP2B6 adalah salah satu enzim terpenting dalam metabolisme CPF, oleh karena itu individu dengan ekspresi CYP2B6 yang lebih tinggi, yaitu CYP2B6*1/*1, lebih rentan terhadap pajanan CPF karena tingkat pembentukan CPF-O yang lebih tinggi, yang ditunjukkan oleh kadar TCPy yang lebih besar.¹¹ CYP2B6*6 memiliki aktivitas kinetik yang serupa dibandingkan

dengan CYP2B6*1 namun diekspresikan pada tingkat yang lebih rendah karena pada varian *6 terjadi *aberrant splicing* yang menghasilkan mRNA dengan jumlah dan fungsi yang sangat berkurang sehingga menyebabkan ekspresi enzim yang lebih rendah,⁵¹ dengan demikian mengurangi kemampuannya untuk mengaktifkan pembentukan CPF-O.¹⁰ CYP2C19 berperan dalam proses detoksifikasi CPF menjadi metabolit inaktif TCPy. Variasi genetik CYP2C19*2 dan *3 diduga memiliki aktivitas enzimatis yang lebih rendah yang mengakibatkan menurunnya proses detoksifikasi CPF.^{10,43} Akan tetapi, hasil dalam penelitian saat ini tidak menunjukkan adanya perbedaan kadar TCPy berdasarkan variasi genetik CYP2C19.

Analisis statistik menunjukkan bahwa kadar TCPy yang lebih tinggi didapatkan pada subjek dengan genotipe CYP2B6*1/*1 ($p = 0,002$). Indeks massa tubuh berhubungan negatif dengan kadar TCPy ($p = 0,006$) sedangkan mereka yang diklasifikasikan sebagai tidak merokok ($p = 0,004$), kelompok DPK tinggi ($p = 0,012$) dan melakukan penyemprotan pada waktu selain pagi hari ($p = 0,014$) memiliki konsentrasi TCPy yang lebih tinggi. TCPy sebagai metabolit spesifik pajanan CPF berhubungan positif dengan DPK dengan kelompok DPK tinggi yang ditandai dengan frekuensi penggunaan APD yang rendah dan praktik kerja yang buruk memiliki konsentrasi TCPy yang lebih tinggi. TCPy urin secara bermakna lebih rendah di antara perokok daripada non-perokok, diduga hal ini berhubungan dengan adanya gangguan dalam metabolisme atau eliminasi xenobiotik yang terjadi pada perokok.^{130,131} Indeks massa tubuh (IMT) yang lebih tinggi dalam penelitian ini berhubungan dengan kadar TCPy yang lebih rendah. Hal ini terjadi karena senyawa induk klorpirifos bersifat lipofilik, sehingga jaringan lemak mungkin memainkan peran penting dalam laju eliminasi CPF.³¹ CPF yang terikat sementara waktu pada jaringan lemak akan dilepaskan dan mengalami metabolisme membentuk CPF-O sehingga efek yang ditimbulkan dapat berlangsung dalam jangka waktu yang lebih panjang.^{28,31} Oleh karenanya, penting bagi setiap penyemprot pestisida untuk berada dalam keadaan gizi terbaik dengan IMT yang ideal untuk mengurangi kemungkinan laju eliminasi CPF yang lebih lambat. Waktu penyemprotan di pagi hari memiliki efek dalam pengendalian pajanan. Pada pagi hari, udara cenderung lebih tenang sehingga mengurangi risiko bahan kimia

terhirup secara tidak sengaja karena angin kencang. Suhu yang lebih rendah dan kelembaban yang relatif lebih tinggi di pagi hari menyebabkan pestisida yang disemprotkan mungkin tidak mengalami penguapan sebesar pada siang hari.

Profil pemeriksaan tiroid dalam median (minimum–maksimum) berturut-turut untuk TSH, FT4, tiroglobulin dan rasio Tg/FT4 adalah 1,46 (0,01–10,30) uIU/mL, 1,17 (0,79–6,85) ng/dL, 7,87 (0,43–76,92) ng/mL, dan 6,23 (0,37–91,57) $\times 10^2$. Kadar TSH lebih tinggi diperoleh pada kelompok terpajan tinggi ($p = 0,002$). Kadar EYU ($p = 0,026$) dan FT4 ($p = 0,033$) berhubungan negatif dengan kadar TSH sedangkan rasio Tg/FT4 ($p < 0,001$) dan jumlah hari setelah penyemprotan ($p = 0,003$) berhubungan positif dengan TSH.

Hubungan positif antara jumlah hari setelah penyemprotan dengan konsentrasi TSH mungkin menunjukkan bahwa petani terkena pajanan pestisida pada tingkat tertentu yang lebih berpotensi menyebabkan efek kronik atau kumulatif daripada efek akut pada tiroid. Kadar EYU berhubungan negatif dengan konsentrasi TSH. Defisiensi yodium yang diindikasikan dengan EYU $< 100 \mu\text{g/L}$ diketahui berhubungan dengan peningkatan konsentrasi TSH dan sebaliknya kelebihan asupan yodium berlebihan berhubungan dengan penurunan TSH pada populasi.^{140,141}

Sejumlah studi epidemiologi mengenai dampak pajanan pestisida pada tiroid yang dipublikasikan sejauh ini menyebutkan pajanan pestisida menurunkan hormon tiroid dalam sirkulasi dan meningkatkan konsentrasi TSH. Penelitian pada hewan coba menunjukkan bahwa klorpirifos berhubungan dengan gangguan tiroid yang diduga berkaitan dengan kerusakan struktural pada jaringan tiroid.¹⁴⁸

Pada penelitian ini, median kadar TSH kelompok DPK tinggi lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok DPK rendah. Median konsentrasi FT4 berhubungan negatif terhadap TSH, sebaliknya rasio Tg/FT4 berhubungan positif dengan TSH. Hal tersebut memunculkan pendapat bahwa kerusakan folikel tiroid akibat pajanan CPF memberi pengaruh negatif yang lebih besar kepada jalur sintesis hormon dibandingkan pada sintesis tiroglobulin. Menggunakan argumentasi bahwa CPF menyebabkan kerusakan pada epitelial folikel tiroid, maka dapat dimengerti bahwa proses sintesis hormon tiroid dan sintesis tiroglobulin tidak dapat berlangsung dengan optimal pada folikel tiroid yang mengalami degenerasi,

deskuamasi, dan obliterasi lumen koloidal. Gangguan dalam proses sintesis hormon tiroid ini mengakibatkan berkurangnya hormon yang tiroid yang dihasilkan dan memicu terjadinya mekanisme umpan balik yang mengakibatkan peningkatan sekresi TSH oleh hipofisis. Peningkatan TSH menginisiasi proses sintesis hormon tiroid sekaligus menstimulasi sintesis tiroglobulin yang berperan sebagai bahan baku produksi hormon. Oleh karenanya, kadar TSH yang meningkat dan perbandingan kadar tiroglobulin terhadap kadar FT4 dianggap berpotensi menjadi faktor yang menggambarkan disrupsi fungsi tiroid akibat paparan CPF. Fenomena tersebut teramati dalam penelitian saat ini yang sekaligus memberikan penjelasan bahwa rasio Tg/FT4 merupakan faktor utama yang berkontribusi pada kadar TSH dalam model akhir analisis regresi linier ganda.

Analisis jalur dilakukan untuk menguji model hubungan kausalitas faktor-faktor yang berkontribusi terhadap fungsi tiroid. Variabel eksogen dalam model adalah CYP2B6, FT4, EYU dan DPK, sementara variabel endogen terdiri dari TCPy, AChE, DPK, rasio Tg/FT4 dan TSH. Polimorfisme genetik CYP2B6 diuji sebagai variabel independen untuk TCPy, sementara DPK merupakan variabel independen untuk TCPy, AChE, rasio Tg/FT4, dan TSH. Rasio Tg/FT4 diuji sebagai variabel independen terhadap TSH. Model ini merupakan model yang fit karena memenuhi kriteria nilai $p > 0,05$; $CFI \geq 0,90$; TFI, NFI dan $GFI \geq 0,95$; serta RMSEA dan $SRMR < 0,08$. Model analisis jalur menunjukkan bahwa CYP2B6*6 memberikan efek negatif terhadap kadar TCPy yang berarti subjek dengan variasi genetik CYP2B6*6 akan memiliki kadar TCPy yang lebih rendah yang sekaligus dapat menggambarkan tingkat paparan yang lebih rendah. AChE di sisi lain menerima efek negatif dari DPK, sehingga subjek dengan DPK tinggi akan mengalami inhibisi AChE lebih besar dengan akibat aktivitas AChE yang lebih rendah. Rasio Tg/FT4 ($\beta = 0,490$; $p < 0,001$) dan DPK ($\beta = 0,175$; $p = 0,018$) memiliki efek langsung positif terhadap TSH. Efek tidak langsung DPK pada TSH didapati melalui rasio Tg/FT4 sebesar 0,104 dan bersama efek langsung sebesar 0,175 memberikan efek total terhadap TSH sebesar 0,279. AChE dan TCPy memiliki korelasi positif. Seluruh koefisien dalam analisis jalur bermakna pada $p < 0,05$ dan model ini dapat menjelaskan 30,7% varian TSH pada subjek.

KETERBATASAN DAN KEKUATAN PENELITIAN

Jumlah aktual CPF atau komposisi campuran yang digunakan tidak diukur secara langsung dan analisis terhadap kombinasi pestisida yang digunakan tidak dilakukan dalam penelitian ini. Berkaitan dengan kegiatan pertanian di mana semua informasi yang diperoleh dilaporkan sendiri oleh petani, kesalahan secara acak atas perkiraan besar pajanan dan klasifikasi pajanan sangat mungkin terjadi. Oleh karena itu, untuk membatasi kemungkinan kesalahan klasifikasi, beberapa pertanyaan ditanyakan kembali secara acak untuk menentukan konsistensi jawaban. Pajanan CPF juga dapat berasal dari mengonsumsi makanan atau minuman yang terkontaminasi, selain itu diketahui bahwa makanan tertentu dapat memengaruhi kadar yodium yang penting dalam biosintesis tiroid, namun informasi asupan makanan tidak dikumpulkan. Meskipun peserta diminta untuk mengikuti tahap kedua dalam waktu yang ditentukan, yaitu 1 hari setelah kegiatan penyemprotan, karena alasan tertentu mereka hadir sesuai dengan waktu luangnya, sehingga dapat memengaruhi konsentrasi metabolit yang terdeteksi. Lokasi kromosom varian SNP tidak teramati dalam penelitian ini, sehingga individu yang merupakan pembawa alel CYP2B6 785A>G dan 516G>T dapat menjadi heterozigot untuk alel CYP2B6*6 atau *compound heterozygote* *4/*9. Terlepas dari potensi interaksi yang kompleks dalam pestisida gabungan yang digunakan oleh petani, desain potong lintang yang digunakan menjadikan hubungan sebab akibat antara pajanan CPF dan disfungsi tiroid tidak dapat dikonfirmasi berdasarkan hubungan temporal.

Jumlah subjek yang berpartisipasi dalam penelitian ini sesuai dengan yang direncanakan. Sejauh pengetahuan peneliti, ini adalah laporan pertama dari frekuensi distribusi polimorfisme gen CYP2B6*6 dalam kaitannya dengan konsentrasi TCPy pada populasi pertanian Indonesia. Dilakukannya pengukuran terhadap penanda pajanan CPF (TCPy, AChE), kerentanan (CYP2B6, CYP2C19) dan penanda efek berupa parameter fungsi tiroid yaitu, TSH, FT4 dan tiroglobulin yang merupakan penanda penting dalam sintesis hormon tiroid untuk menilai perubahan fungsi tiroid pada subjek merupakan salah satu kekuatan penelitian ini. Penggunaan metode kuantitatif yang divalidasi untuk estimasi DPK yang didukung oleh informasi rinci tentang karakteristik pekerjaan terpajan pestisida juga merupakan kekuatan dalam penelitian ini.

SIMPULAN DAN SARAN

Kebutuhan akan penggunaan pestisida kimia, khususnya insektisida CPF oleh petani sepertinya merupakan hal yang tidak dapat dihindarkan. Penelitian ini menyajikan bukti terjadinya disrupsi fungsi tiroid pada penyemprot pestisida dengan pajanan utama CPF dan faktor yang berkontribusi di dalamnya.

Penyemprot pestisida dengan pajanan utama CPF memiliki karakteristik berupa tingginya proporsi praktik penggunaan pestisida gabungan dengan kekerapan kontak langsung terhadap pestisida, rendahnya frekuensi penggunaan APD, yang disertai tingginya volume pestisida yang disemprotkan dan lahan olahan yang luas. Variasi genetik CYP2B6*6 berhubungan dengan kadar TCPy yang lebih rendah, menunjukkan potensi variasi genetik CYP2B6*6 sebagai markah kerentanan pajanan CPF. Aktivitas AChE dan TCPy berhubungan linier dengan DPK, mengindikasikan hubungan dosis-respons akibat pajanan CPF. Dosis pajanan kumulatif tinggi berhubungan dengan kadar TSH yang lebih tinggi dan rasio tiroglobulin/FT4 yang lebih besar, menggambarkan adanya ketidakseimbangan hormonal sebagai indikator terjadinya disrupsi pada fungsi tiroid. Konsentrasi TSH pada penyemprot pestisida dengan pajanan utama CPF dipengaruhi oleh interaksi variasi genetik CYP2B6*6, kadar TCPy, aktivitas AChE eritrosit, DPK dan rasio tiroglobulin/FT4, menunjukkan hubungan dosis-respons dalam menimbulkan efek disrupsi tiroid.

Dengan menggunakan pendekatan berbasis pencegahan maka pengelolaan kesehatan pada petani penyemprot pestisida perlu memperhatikan sejumlah faktor di antaranya dosis pajanan, potensi efek kesehatan yang ditimbulkan dan kerentanan genetik individu. Langkah-langkah yang perlu dilakukan pada keadaan ini berupa pengendalian pajanan, diikuti oleh upaya monitoring biologis terhadap pajanan, deteksi dini masalah kesehatan pada pekerja, dan identifikasi kerentanan individu. Menurunkan dosis pajanan kumulatif akan memberikan manfaat yang bermakna terhadap potensi dampak kesehatan akibat pajanan CPF, khususnya pada fungsi tiroid. Upaya ini dapat dilakukan dengan pengendalian administratif melalui pelatihan dan pendampingan tentang pemilihan, penggunaan dan pengelolaan pestisida secara komprehensif yang disertai dengan pengasuhan berkelanjutan perlu diberikan kepada petani pada umumnya dan khususnya pada penyemprot pestisida, serta mendorong penggunaan APD dan pakaian kerja yang memadai.

SUMMARY

INTRODUCTION

Indonesia is an agricultural country and farmers generally use insecticides to control pests. Farmers' behaviour in using insecticides is generally poor with the use of higher concentrations and more frequent applications. Chlorpyrifos (CPF) is the most frequently used insecticide and may develop certain risks of health problems. CPF toxicity occurs through a series of metabolic processes including bioactivation to the active metabolite chlorpyrifos-oxon (CPF-O) and detoxification to form the inactive metabolite TCPy. In addition, CPF also binds to the enzyme acetylcholinesterase (AChE), so that the decrease in AChE activity is one of the important biomarkers of CPF exposure. The balance between the activation and detoxification reactions of chlorpyrifos is influenced by the presence of other xenobiotics, the activity of the enzyme paraoxonase-1 (PON-1) and cytochrome P450 (CYP) enzymes such as CYP2B6 and CYP2C19 which affect the individual's response to xenobiotics.^{9,10}

CPF exposure in pesticide sprayers assessed by cumulative exposure level (CEL), PON-1, AChE and TCPy in their interaction with genetic variations CYP2B6, CYP2C19 as the biomarkers of individual susceptibility to CPF exposure may alter thyroid function. Previous studies showed morphological and histopathological changes in the thyroid of experimental animals after exposure to low doses of chlorpyrifos. It is thought that the decrease in thyroid hormone levels is related to the destruction of thyroid follicular cells and further interferes with the process of thyroid hormone synthesis. However, to date, there is limited evidence showing a direct toxic effect of CPF on organs or tissues other than the nervous system and therefore the exact mechanism of thyroid damage is not fully understood.^{15,16,90} Epidemiological studies on the impact of chlorpyrifos exposure on thyroid disorders in humans are also limited and inconclusive.

Therefore, this study was conducted to determine the role of PON-1, AChE, and TCPy as the biomarkers of CPF exposure, polymorphisms of CYP2B6 and CYP2C19 as biomarkers of susceptibility, and the ratio of thyroglobulin/FT4 (Tg/FT4), FT4 and TSH as biomarkers of effects of thyroid disorders due to CPF exposure. In Occupational

Medicine, the result of this study will be useful in early detection and diagnosis of work-related thyroid diseases as well as their prevention and control measures.

METHODS

This cross-sectional study was conducted in July–October 2020. A total of 151 garlic and vegetable farmers who used CPF for at least 1 year in Pancot and Adipuro Village, Central Java participated in this study. The data on the characteristics of the subjects and the estimation of cumulative exposure level (CEL) were taken by interview. Cumulative exposure level (CEL) was calculated using the validated method from Dosemeci in Agricultural Health Study.⁶³ Question regarding sociodemographic characteristics consists of several questions such as age, gender, smoking habit and educational background. The interview for agricultural work-related (occupational) characteristics consisted of several specific questions on those related to pesticide exposure, work practice, and the use of personal protective equipment (PPE).

Serum creatinine, blood glucose, ALT, AST test were done by Prodia Occupational Health Center (OHC) Cikarang using commercial kits in Proline R-910 platform in accordance with manufacturer standard. The thyroid parameters i.e., TSH, FT4, and thyroglobulin were analyzed under Electrochemiluminescence Immunoassay (ECLIA) method in Roche Cobas e-411 platform using diagnostic reagents Elecsys TSH, Elecsys FT4 III, and Elecsys Tg II in accordance with manufacturer protocols and standard clinical laboratory methods.

Urinary iodine excretion (UIE), PON-1, AChE and TCPy were analyzed by Prodia Industrial Toxicology Laboratory. Urinary iodine was analyzed using Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS) according to CDC 3002.1 method.¹⁰⁰ Serum PON-1 was determined spectrophotometrically using nitrophenol as standard. The standard solution and the sample solution were read at a wavelength of 405 nm. Red blood cell AChE activity was determined photometrically by the Ellmann method. Urinary TCPy concentrations were detected in spot urine sample using Agilent Ultivo triple quadrupole mass spectrometer (Agilent Technologies, Singapore) with Masshunter software program was used for data acquisition and data analysis. The extraction procedure was adopted with small adjustment from Smith et.al.¹⁰¹ while the separation and

detection procedure were adopted with little modification from CDC 6103.03 laboratory method.¹⁰² Chromatographic separation was performed using Agilent *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC Infinity 1260, Germany). The detectable TCPy concentrations were adjusted by urinary creatinine concentrations.

Genotyping assay was performed by Laboratorium Klinik Prodia. CYP2C19*2 and *3 was analyzed using PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism). During the RFLP phase, specific restriction enzyme/ endonuclease was added to DNA fragment and identified with electrophoresis gel. SmaI restriction enzyme was used in CYP2C19*2 analysis while primers *forward* 5'–CAGAGCTTGGCATATTGTATC–3' and *reverse* 5'–GTAAACACACA ACTAGTCAATG – 3' were used in the PCR amplification process. In addition, BamHI restriction enzyme was used in CYP2C19*3 analysis and the amplification process were done using primers *forward* 5'-AAATTGTTTCCAATCATTAGCT-3' and *reverse* 5'-ACTTCAGGGCTTGGT CAATA-3'.

The CYP2B6 – 516G>T (rs3745274) was analyzed using TaqMan® SNP Genotyping Assay C__7817765_60 (Applied Biosystems, CA, USA) as the primers and probe on the Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH, Germany) thermocycler. TaqMan GTXpress Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA) was used as the master mix of PCR reagent. The laboratory kit was intended for research use only. Genotypes were determined by the allelic discrimination plot using fluorescence signals from TaqMan probe according to the manufacturer's instruction. The CYP2B6 – 785A>G (rs2279343) genotype was analyzed using Sanger sequencing method. Samples were amplified by PCR with primers as described by Zakeri et.al.⁵³ and produced a 640 bp PCR product for sequencing. All of the sequencing method was performed by 1st BASE DNA Sequencing Division, Apical Scientific Sdn Bhd, Selangor, Malaysia.

The analysis was performed using SPSS 20 for Windows. The Mann-Whitney U and Kruskal Wallis test was used to measure the difference in numerical variables according to the individual and occupational characteristics. Allele and genotype frequencies were calculated directly. Multiple linear regression analysis was used

to examine the association between thyroid function and its contributing factors. Variables associated with thyroid function at a significance level of $p \leq 0.20$ in the simple regression analysis were included in the multivariate model. Following the stepwise procedure, all contributing variables associated with thyroid function at a significance level of 0.05 were retained in the final model. Path analysis was performed with JASP version 0.14.1 (University of Amsterdam) to test the causal relationship model of factors contributing to TSH. 95% confidence interval and p value of 0,05 were applied. The study protocol was approved by the Ethical Committee of the Faculty of Medicine Universitas Indonesia on March 23, 2020 (No. KET-339/UN2.F1/ETIK/PPM.00.02/2020).

RESULTS AND DISCUSSION

There were 195 vegetable farmers aged 18–65 years who were actively using CPF for at least one year and gave written consent to participate in the study as the sample frame of the study.

In the first phase, the subjects were interviewed for sociodemographic and occupational (i.e., agricultural work-related) characteristics and underwent a health examination. During the health examination, height and weight were measured, and at the same time, spot urine and blood samples were taken to test for urinary iodine excretion (UIE), and blood chemistry (serum creatinine, aspartate aminotransferase-AST, alanine aminotransferase-ALT). In the second phase, 20 participants did not come at the appointed time, so they were considered to have withdrawn from the study. Only 175 participants took part in this phase and received an explanation of the results of their respective screening tests. Among those who attended the second phase, there were 24 participants who had UIE < 50 $\mu\text{g/L}$, or have kidney disease, or decide not to continue the participation, or do not complete the confirmation of their medical and occupational history were excluded from the study. Due to the limited number of urine samples available, only 132 subjects had their TCPy results corrected with urine creatinine.

The mean (standard deviation; SD) age was 50 (SD 9.4) years. Among them, 137 (91%) were male, 140 (93%) were members of local farmer' society, 131 (87%) had low educational level with 10 out of 132 subjects in low educational level had

never attended formal education and 73 (48%) were smokers. The mean (SD) and median (min–max) of CEL were 32.44 (24.78) and 25.95 (0.40–136.58). The CEL was classified into two groups, high and low exposure group, with the median as the cut-off point.

Most of the subjects had reported direct contact with pesticides and being splashed or spilt during preparation or spraying activity. Contradictory, the proportion of proper PPE use in our study population was 2% while the proportion of ‘no PPE used’ was 15%. Most frequently used PPE in study population were face mask (cloth masks or surgical masks) and boots which did not provide sufficient protection against CPF exposure. However, we also found that appropriate clothing (i.e. long sleeve and long trousers) while spraying pesticides were associated with lower cumulative exposure. These findings are relevant to reduced exposure because long sleeves and trousers provide a partial barrier against direct contact due to splashes or spills.^{112,113}

Significantly few farmers reported using pesticides according to the user instructions (2.0%), and all of them were in the low CEL group. The number of days spraying per year was considered high, with 104 days per year on average. Regarding the use of pesticides, 94% of our subjects reported using two or more pesticides. Nearly half of the subjects used additional insecticides with the active ingredients abamectin or beta cyfluthrin or methomyl. Those three pesticides were classified as IB in WHO classification, indicating higher potential of acute toxicity. Although no association was found between the use of multiple pesticides with biomarkers of exposure or effects on thyroid, the tendency to use complex mixtures of pesticides in agricultural practice should remain a concern because of the potential interaction of the mixtures used and the possibility of acute toxicity associated with the unsafe use.

The median (min–max) of PON1, AChE, and TCPy were 120.93 (49.55–196.57) mol/L, 8.03 (4.15–14.13) U/g haematocrit, dan 2.31 (0.17–49.12) µg/g creatinine, respectively. Paraoxonase-1 plays a role in the detoxification process of CPF-O resulting from the phase 1 metabolism of chlorpyrifos in the liver to diethylphosphate (DEP) and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCPy).³⁸ There were no

significant differences in PON-1 levels according to occupational characteristics. This might be due to some reasons that CPF metabolism also involves a number of enzymes including carboxylesterase, butyrylcholinesterase, or CYP as well as the PON-1 gene polymorphisms that may impair the enzyme activities. AChE was associated with CEL, age, days after spraying, and TCPy. AChE activity was significantly lower in the low CEL group ($p < 0.001$) indicating that subjects were exposed to chemicals with AChE inhibition properties, CPF in particular.^{30,31}

The genotype frequency of CYP2B6 were as follows *1/*1 (32 %); *1/*6 (50 %); dan *6/*6 (18 %) while for CYP2C19 *1/*1, *1/*3, *1/*2, and *2/*2 were 64 %, 7 %, 23 % and 6 %, respectively. The median TCPy concentrations were significantly associated with CYP2B6*6 ($p = 0.005$). Subjects with CYP2B6 *1/*1 had higher TCPy compared to *1/*6 or *6/*6 and shows significant difference at $p = 0.039$ and $p = 0.002$, respectively. Since the CYP2B6 is one of the most important enzymes in CPF metabolism, individuals with higher CYP2B6 expression (i.e., CYP2B6*1/*1) are more susceptible to exposure due to the higher CPF-O formation and further indicated by higher TCPy concentrations.¹¹ Regarding to its effects on CPF metabolism, CYP2B6*6 has similar kinetic activity compared to CYP2B6*1, however it is expressed at lower levels due to the aberrant splicing,⁵¹ thereby reducing its ability to activate CPF-O formation.¹⁰ CYP2C19 plays a role in the detoxification process of CPF to form the inactive metabolite TCPy. Genetic variations of CYP2C19*2 and *3 was thought to have lower enzymatic activity which results in a decrease in the CPF detoxification process.^{10,43} However, the results in the current study did not show any differences in TCPy levels based on genetic variations of CYP2C19.

TCPy concentrations were higher among subjects with CYP2B6*1/*1 genotype ($p = 0.002$). Body mass index ($p = 0.006$) was negatively associated with the levels of TCPy while those classified as not smoking ($p = 0.004$), high CEL group ($p = 0.012$) or those who sprayed pesticides other than in the morning time ($p = 0.014$) had higher TCPy concentrations. TCPy as a specific metabolite of CPF exposure was positively associated with CEL. High CEL group had a higher TCPy concentrations. Urine TCPy was significantly lower in smokers than in non-smokers, suggesting this may be related to impaired metabolism or xenobiotic

elimination that occurs in smokers.^{130,131} Higher body mass index (BMI) in this study was associated with lower TCPy levels. Chlorpyrifos parent compound is highly lipophilic, so that the highest concentrations are present in the fat or adipose tissues, leading to the speculation that lipid storage may play an important role in the CPF elimination rates.³¹ CPF that was temporarily bound to fat tissue will be released and undergo metabolism to form CPF-O so that the effect may last longer.^{28,31} Therefore, it is important for every pesticide sprayer to maintain their ideal BMI to reduce the possibility of slower CPF elimination rates. Spraying time in the morning has an effect on exposure control. In the morning, the air tends to be calmer, reducing the risk of accidentally inhaling chemicals from strong winds. Lower temperatures and higher relative humidity in the morning mean that the pesticide sprayed may not evaporate as much as during the day.

The median (min–max) of TSH, FT4, thyroglobulin and Tg/FT4 ratio were 1.46 (0.01–10.30) uIU/mL, 1.17 (0.79–6.85) ng/dL, 7.87 (0.43–76.92) ng/mL, and 6.23 (0.37–91.57) $\times 10^2$, respectively. The TSH concentration were higher in the high-exposed group ($p = 0.002$). Urinary iodine excretion (UIE) ($p = 0.026$) and FT4 ($p = 0.033$) were negatively associated with the levels of TSH, while Tg/FT4 ratio ($p < 0.001$) and days after spraying ($p = 0.003$) were positively associated with TSH concentration.

The post spraying duration time (days) was positively associated with TSH concentrations. We consider these findings suggest that farmers were exposed to certain levels of pesticide exposure that have the potential to cause chronic or cumulative effects rather than acute effects on the thyroid. UIE was negatively associated with TSH concentration. Iodine deficiency, indicated with UIE below 100 $\mu\text{g/L}$ in population, was associated with serum TSH concentration. Conversely, excess iodine will subsequently be associated with decreased TSH.^{140,141}

The majority of epidemiological studies published so far addressing the thyroid impacts on pesticide exposed farmers reported decreased circulating thyroid hormones and increased TSH concentration. Animal studies suggest that chlorpyrifos is associated with thyroid disruption that postulated to be attributed to structural damage of CPF to thyroid tissue.¹⁴⁸

We found that median TSH concentrations were higher among high CEL group. The median FT4 concentration was negatively associated with TSH, while Tg/FT4 ratio was positively associated with TSH. This situation raises the opinion that the thyroid follicular damage due to CPF exposure has a greater negative effect on the thyroid hormone synthesis pathway than thyroglobulin. Using the argument that CPF causes damage to the thyroid follicular epithelium, it was thought that the thyroid hormone and thyroglobulin synthesis process runs under non-optimal conditions. The disruption in thyroid hormone synthesis leads to a relatively low circulating thyroid hormone and a feedback mechanism to anterior pituitary occurs resulting in increased TSH secretion. The thyroid hormone synthesis was then initiated and increased TSH secretion also stimulates thyroglobulin synthesis. Therefore, increased TSH levels and Tg/FT4 ratio are considered as potential factors indicating thyroid disruption due to CPF exposure. This phenomenon was observed in this study and also provides an explanation that the Tg/FT4 ratio is the main factor that contributes to TSH levels in multiple linear regression analysis.

Pathway analysis was performed to examine the causal relationship model of factors contributing to thyroid function. Exogenous variables were CYP2B6, FT4, UIE and CEL, while TCPy, AChE, CEL, Tg/FT4 ratio and TSH were endogenous variables. CYP2B6 gene polymorphism was tested as an independent variable for TCPy. CEL was an independent variable for TCPy, AChE, Tg/FT4 ratio, and TSH while Tg/FT4 ratio was tested as the independent variable to TSH. The model was fit due to several parameters i.e. $p > 0.05$; $CFI \geq 0.90$; TFI , NFI and $GFI \geq 0.95$; $RMSEA$ and $SRMR < 0.08$. In the path analysis model, CYP2B6*6 has a negative effect on TCPy, suggesting that subjects with CYP2B6*6 gene polymorphism will have lower exposure level as indicated with lower TCPy levels. On the other hand, CEL has a negative effect on AChE, therefore higher CEL will results in lower AChE activity. Tg/FT4 ratio ($\beta = 0.490$; $p < 0.001$) and CEL ($\beta = 0.175$; $p = 0.018$) have a positive direct effect on TSH. Indirect effect of CEL to TSH was found through Tg/FT4 ratio of 0,104 and giving a total effect of 0.279 to TSH. AChE and TCPy were positively correlated. CEL has a direct effect with a path coefficient of 0.21 on the ratio of Tg/FT4 and a total effect of 0.28 on TSH. The Tg/FT4 ratio has

a direct effect of 0,49 to TSH. All of the coefficients were significant at $p < 0.05$ and the contribution of CEL and Tg/FT4 ratio to the subject' TSH was 30.7%.

LIMITATIONS AND STRENGTH OF THE STUDY

The amount of CPF or composition of the mixture used was not actually measured directly and analysis of the combination of pesticides used was not carried out in this study. All of the information regarding agricultural activities were self-reported by the farmers that may result in exposure misclassification. However, the possibility of misclassification has been limited by randomly asking several important questions to determine the answers' consistency. Occupationally exposed farmers may also be exposed to pesticides by consuming contaminated food and drink and it also known that certain foods may affect the iodine levels which is important in thyroid biosynthesis, however, the information on daily food consumption was not collected. Although the participants were asked to attend the second phase in specified time, which is 1 day after the spraying activity, for some reason they attended according to their free time, so that it could affect the detected metabolite concentrations. The chromosome location of the SNP variant was not assessed, so that individuals who are carriers of both CYP2B6 785A>G and 516G>T alleles could be either heterozygous for the CYP2B6*6 allele (*1/*6) or compound heterozygous (*4/*9). Apart from the potential interactions of complex mixture of pesticides used by the farmers, another limitation regarding our cross-sectional study design made it impossible for us to establish a causal temporal relationship between CPF exposure and thyroid dysfunction.

The number of subjects who participated in this study was sufficient. To the best of our knowledge, this is the first report of the distribution frequencies of CYP2B6*6 gene polymorphisms in association with TCPy concentrations in Indonesian agricultural populations. The measurement of biomarker of CPF exposure (TCPy and AChE), susceptibility (CYP2B6 and CYP2C19) and multiple thyroid parameters i.e., TSH, FT4, and thyroglobulin to characterize the altered thyroid function was a strength of our study. The use of validated quantitative methods for CEL estimation supported by a detailed information on occupational characteristics pesticide was also a strength in our work.

CONCLUSIONS AND SUGGESTIONS

The need for the use of chemical pesticides, especially CPF insecticides by farmers, seems unavoidable. This study provides evidence of impaired thyroid function in pesticide sprayers with primary exposure to CPF and its contributing factors.

Pesticide sprayers were characterized by the high proportion of multiple pesticides used and frequent direct contact with pesticides, low frequency of PPE used accompanied by higher volume of mixture applied and broader acres of land. CYP2B6*6 gene polymorphism was associated with lower TCPy levels in pesticide sprayers, suggesting the potential for CYP2B6*6 as a biomarker of susceptibility to CPF exposure. AChE activity and TCPy levels were linearly associated with CEL, indicating a dose-response relationship due to CPF exposure. Higher TSH concentrations and Tg/FT4 ratio were found in the high CEL group, suggesting hormonal imbalance as an indicator of impaired thyroid function. TSH was influenced by the interaction of genetic variation of CYP2B6*6, TCPy level, AChE activity, CEL and Tg/FT4 ratio, suggesting a dose-response relationship in developing the thyroid disorders.

Using a prevention-based approach, several factors including exposure levels, potential health effects and individual genetic susceptibility should be considered in managing the health of pesticide-spraying farmers. There are some measures that need to be taken in this situation including exposure control, followed by biological monitoring of exposure, early detection of health problems, and individual susceptibility. Reducing the exposure levels would allow a significant benefit to the potential health effects of CPF exposure, particularly on thyroid function. Administrative control through training and assistance in the selection of pesticides, comprehensive pesticide management of comprehensive pesticides accompanied by continuous assistance and encouraging the use of PPE and adequate work clothes for farmers and pesticide sprayers in particular will result in reduced exposure.

DAFTAR PUSTAKA

1. Hasil survey pertanian antar sensus (SUTAS) 2018. Jakarta: Badan Pusat Statistik Indonesia; 2018.
2. Pestisida Pertanian dan Kehutanan Tahun 2016. Jakarta: Direktorat Pupuk dan Pestisida Kementerian Pertanian Republik Indonesia; 2016.
3. Casida JE, Bryant RJ. The ABCs of pesticide toxicology: amounts, biology, and chemistry. *Toxicol Res (Camb)*. 2017;6:755–63.
4. Hidayat F, Khamidi T, Wiyono S. Pengetahuan, sikap, dan tindakan petani di Kabupaten Tegal dalam penggunaan pestisida dan kaitannya dengan tingkat keracunan terhadap pestisida. *Jurnal Bumi Lestari*. 2010;10:1–12.
5. Ardiwinata AN, Nursyamsi D. Residu pestisida di sentra produksi padi di Jawa Tengah. *Pangan*. 2012;21:39–58.
6. Goldner WS, Sandler DP, Yu F, Shostrom V, Hoppin JA, Kamel F, et al. Hypothyroidism and pesticide use among male private pesticide applicators in the agricultural health study. *J Occup Environ Med*. 2013;55:1171–8.
7. Shrestha S, Parks CG, Goldner WS, Kamel F, Umbach D, Ward M, et al. Pesticide use and incident hypothyroidism in pesticide applicators in the Agricultural Health Study. *Environ Health Perspect*. 2018;126:1–12.
8. Ventura C, Nieto MR, Bourguignon N, Lux-Lantos V, Rodriguez H, Cao G, et al. Pesticide chlorpyrifos acts as an endocrine disruptor in adult rats causing changes in mammary gland and hormonal balance. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016;156:1–9.
9. Crane AL, Klein K, Olson JR. Bioactivation of chlorpyrifos by CYP2B6 variants. *Xenobiotica*. 2012;42:1255–62.
10. Crane AL, Klein K, Zanger UM, Olson JR. Effect of CYP2B6*6 and CYP2C19*2 genotype on chlorpyrifos metabolism. *Toxicology*. 2012;293:115–22.
11. Foxenberg RJ, Ellison CA, Knaak JB, Ma C, Olson JR. Cytochrome P450-specific human PBPK/PD models for the organophosphorus pesticides: chlorpyrifos and parathion. *Toxicology*. 2011;285:57–66.
12. Zhou Y, Ingelman-Sundberg M, Lauschke VM. Worldwide Distribution of Cytochrome P450 Alleles: A Meta-analysis of Population-scale Sequencing Projects. *Clin Pharmacol Ther*. 2017;102:688–700.
13. Lacasana M, Lopez-Flores I, Rodriguez-Barranco M, Aguilar-Garduno C, Blanco-Munoz J, Perez-Mendez O, et al. Interaction between organophosphate pesticide exposure and PON1 activity on thyroid function. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010;249:16–24.
14. Dardiotis E, Aloizou AM, Siokas V, Tsouris Z, Rikos D, Marogianni C, et al. Paraoxonase-1 genetic polymorphisms in organophosphate metabolism. *Toxicology*. 2019;411:24–31.

15. De Angelis S, Tassinari R, Maranghi F, Eusepi A, Di Virgilio A, Chiarotti F, et al. Developmental exposure to chlorpyrifos induces alterations in thyroid and thyroid hormone levels without other toxicity signs in CD-1 mice. *Toxicol Sci.* 2009;108:311–9.
16. Jeong SH, Kim BY, Kang HG, Ku HO, Cho JH. Effect of chlorpyrifos-methyl on steroid and thyroid hormones in rat F0- and F1-generations. *Toxicology.* 2006;220:189–202.
17. El-Kerdasy HI, Elsayed AM, Mousa HR. Ameliorative Effect of Ginger Extract and Selenium in the Thyroid Gland Toxicity Induced by Chlorpyrifos in Male Albino Rats. *Egypt J Hosp Med.* 2021;83:824–30.
18. Piccoli C, Cremonese C, Koifman RJ, Koifman S, Freire C. Pesticide exposure and thyroid function in an agricultural population in Brazil. *Environ Res.* 2016;151:389–98.
19. Aprianto D. Hubungan pajanan pestisida dengan gejala hipotiroid dan gangguan reproduksi pada petani di Kecamatan Kersana, Kabupaten Brebes tahun 2014 [Skripsi]. Depok: Universitas Indonesia; 2014.
20. Bantarwati D, Suhartono, Suwondo A. Hubungan pajanan pestisida dengan kejadian hipotiroid pada wanita usia subur di daerah pertanian hortikultura Desa Gombong Kecamatan Belik Pemasang. *JKLI.* 2013;12:138–43.
21. Suhartono, Dharminto. Keracunan pestisida dan hipotiroidisme pada wanita usia subur di daerah pertanian. *Kesmas.* 2010;4:217–22.
22. Situasi dan analisis penyakit tiroid. Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI; 2015.
23. Deshmukh V, Behl A, Iyer V, Joshi H, Dholye JP, Varthakavi PK. Prevalence, clinical and biochemical profile of subclinical hypothyroidism in normal population in Mumbai. *Indian J Endocrinol Metab.* 2013;17:454–9.
24. Colovic MB, Krstic DZ, Lazarevic-Pasti TD, Bondzic AM, Vasic VM. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology.* 2013;11:315-35.
25. Silver KS, Du Y, Nomura Y, Oliveira EE, Salgado VL, Zhorov BS, et al. Voltage-Gated Sodium Channels as Insecticide Targets. *Adv Insect Phys.* 2014;46:389-433.
26. WHO. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2009. Geneva: World Health Organization; 2010.
27. Testai E, Buratti FM, Consiglio ED. Chlorpyrifos. In: Krieger R, editor. *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology.* 3rd ed. London: Elsevier's Science & Technology; 2010. p. 1505–26.
28. Koshlukova SE, Reed NR. Chlorpyrifos. In: Wexler P, editor. *Encyclopedia of Toxicology* 3rd ed. London: Elsevier's Science & Technology; 2014. p. 930–4.

29. Timchalk C. Organophosphorus insecticide pharmacokinetics. In: Krieger R, editor. *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*. 3rd ed. London: Elsevier's Science & Technology; 2010. p. 1409–33.
30. Ting D. Findings on the health effects of chlorpyrifos relevant to its identification as a toxic air contaminant. Office of Environmental Health Hazard Assessment California Environmental Protection Agency; 2017.
31. Eaton DL, Daroff RB, Autrup H, Bridges J, Buffler P, Costa LG, et al. Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. *Crit Rev Toxicol*. 2008;38 Suppl 2:1–125.
32. Jintana S, Sming K, Krongtong Y, Thanyachai S. Cholinesterase activity, pesticide exposure and health impact in a population exposed to organophosphates. *Int Arch Occup Environ Health*. 2009;82:833–42.
33. Mackness M, Mackness B. Human paraoxonase-1 (PON1): Gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles. *Gene*. 2015;567:12–21.
34. Kaur G, Jain AK, Singh S. CYP/PON genetic variations as determinant of organophosphate pesticides toxicity. *J Genet*. 2017;96:187–201.
35. Shunmoogam N, Naidoo P, Chilton R. Paraoxonase (PON)-1: a brief overview on genetics, structure, polymorphisms and clinical relevance. *Vasc Health Risk Manag*. 2018;14:137–43.
36. Rajkovic MG, Rumora L, Barisic K. The paraoxonase 1, 2, and 3 in humans. *Biochem Med*. 2011;21:122–30.
37. Costa LG, Giordano G, Cole TB, Marsillach J, Furlong CE. Paraoxonase 1 (PON1) as a genetic determinant of susceptibility to organophosphate toxicity. *Toxicology*. 2013;307:115–22.
38. Teodoro M, Briguglio G, Fenga C, Costa C. Genetic polymorphisms as determinants of pesticide toxicity: Recent advances. *Toxicol Rep*. 2019;6:564–70.
39. Sunay SZ, Kayaalti Z, Bayrak T, Soylemezoglu T. Effect of paraoxonase 1 192 Q/R polymorphism on paraoxonase and acetylcholinesterase enzyme activities in a Turkish population exposed to organophosphate. *Toxicol Ind Health*. 2015;31:1061–8.
40. Costa LG, Giordano G, Furlong CE. Pharmacological and dietary modulators of paraoxonase 1 (PON1) activity and expression: the hunt goes on. *Biochem Pharmacol*. 2011;81:337–44.
41. Ferretti G, Bacchetti T. Effect of dietary lipids on paraoxonase-1 activity and gene expression. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2012;22:88–94.
42. Liao P-Y, Lee KH. From SNPs to functional polymorphism: The insight into biotechnology applications. *Biochem Eng J*. 2010;49:149–58.
43. Johansson I, Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphism and toxicology—with emphasis on cytochrome P450. *Toxicol Sci*. 2011;120:1–13.

44. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther.* 2013;138:103–41.
45. Brown SA, Pereira N. Pharmacogenomic impact of CYP2C19 variation on Clopidogrel therapy in precision cardiovascular medicine. *J Pers Med.* 2018;8.
46. Imaishi H, Goto T. Effect of genetic polymorphism of human CYP2B6 on the metabolic activation of chlorpyrifos. *Pestic Biochem Physiol.* 2018;144:42–8.
47. Croom EL, Wallace AD, Hodgson E. Human variation in CYP-specific chlorpyrifos metabolism. *Toxicology.* 2010;276:184–91.
48. Human assembly and gene annotation [Internet]. 2021 [cited August 14, 2021]. Available from: https://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/.
49. Hedrich WD, Hassan HE, Wang H. Insights into CYP2B6-mediated drug-drug interactions. *Acta Pharm Sin B.* 2016;6:413–25.
50. Zanger UM, Klein K. Pharmacogenetics of cytochrome P450 2B6 (CYP2B6): advances on polymorphisms, mechanisms, and clinical relevance. *Front Genet.* 2013;4:24.
51. Hofmann MH, Blievernicht JK, Klein K, Saussele T, Schaeffeler E, Schwab M, et al. Aberrant splicing caused by single nucleotide polymorphism c.516G>T [Q172H], a marker of CYP2B6*6, is responsible for decreased expression and activity of CYP2B6 in liver. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;325:284–92.
52. Dehbozorgi M, Kamalidehghan B, Hosseini I, Dehghanfard Z, Sangtarash MH, Firoozi M, et al. Prevalence of the CYP2C19*2 (681 G>A), *3 (636 G>A) and *17 (806 C>T) alleles among an Iranian population of different ethnicities. *Mol Med Rep.* 2018;17:4195–202.
53. Zakeri S, Amiri N, Pirahmadi S, Djadid ND. Genetic Variability of CYP2B6 Polymorphisms in Southeast Iranian Population: Implications for Malaria and HIV/AIDS Treatment. *Arch Iran Med.* 2014;17:685–91.
54. Hananta L, Astuti I, Sadewa AH, Alice J, Hutagalung J, Mustofa. The prevalence of CYP2B6 gene polymorphisms in malaria-endemic population of Timor in East Nusa Tenggara Indonesia. *Osong Public Health Res Perspect.* 2018;9:192–6.
55. Yuce-Artun N, Kose G, Suzen HS. Allele and genotype frequencies of CYP2B6 in a Turkish population. *Mol Biol Rep.* 2014;41:3891–6.
56. Ellison CA, Abou El-Ella SS, Tawfik M, Lein PJ, Olson JR. Allele and genotype frequencies of CYP2B6 and CYP2C19 polymorphisms in Egyptian agricultural workers. *J Toxicol Environ Health A.* 2012;75:232–41.
57. Guan S, Huang M, Chan E, Chen X, Duan W, Zhou SF. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2B6 gene in Han Chinese. *Eur J Pharm Sci.* 2006;29:14–21.

58. Arenaz I, Vicente J, Fanlo A, Vasquez P, Medina JC, Conde B, et al. Haplotype structure and allele frequencies of CYP2B6 in Spaniards and Central Americans. *Fundam Clin Pharmacol*. 2010;24:247–53.
59. Jacob RM, Johnstone EC, Neville MJ, Walton RT. Identification of CYP2B6 sequence variants by use of multiplex PCR with allele-specific genotyping. *Clin Chem*. 2004;50:1372–7.
60. Sukprasong R, Chuwongwattana S, Koomdee N, Jantararoungtong T, Prommas S, Jinda P, et al. Allele frequencies of single nucleotide polymorphisms of clinically important drug-metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, and CYP3A4 in a Thai population. *Sci Rep*. 2021;11:12343.
61. Zhou Q, Yu XM, Lin HB, Wang L, Yun QZ, Hu SN, et al. Genetic polymorphism, linkage disequilibrium, haplotype structure and novel allele analysis of CYP2C19 and CYP2D6 in Han Chinese. *Pharmacogenomics J*. 2009;9:380–94.
62. Carles C, Bouvier G, Lebailly P, Baldi I. Use of job-exposure matrices to estimate occupational exposure to pesticides: A review. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. 2017;27:125–40.
63. Dosemeci M, Alavanja MC, Rowland AS, Mage D, Zahm SH, Rothman N, et al. A quantitative approach for estimating exposure to pesticides in the Agricultural Health Study. *Ann Occup Hyg*. 2002;46:245–60.
64. Carvalho DP, Dupuy C. Thyroid hormone biosynthesis and release. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;458:6–15.
65. Thompson W, Russell G, Baragwanath G, Matthews J, Vaidya B, Thompson-Coon J. Maternal thyroid hormone insufficiency during pregnancy and risk of neurodevelopmental disorders in offspring: A systematic review and meta-analysis. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2018;88:575–84.
66. Razvi S, Bhana S, Mrabeti S. Challenges in Interpreting Thyroid Stimulating Hormone results in the diagnosis of thyroid dysfunction. *J Thyroid Res*. 2019;2019:4106816.
67. Kleinau G, Neumann S, Gruters A, Krude H, Biebermann H. Novel insights on thyroid-stimulating hormone receptor signal transduction. *Endocr Rev*. 2013;34:691–724.
68. Barrett EJ. The thyroid gland. In: Boron WF, Boulpaep EL, editors. *Medical Physiology*. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier, Inc; 2017.
69. Kopp P. Thyroid hormone synthesis. In: Braverman L, Cooper D, editors. *Werner & Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text*. 10th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 48–73.
70. Salvatore D, Davies TF, Schlumberger M-J, Hay ID, Larsen PR. Thyroid physiology and diagnostic evaluation of patients with thyroid disorders. In: Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Kronenberg HM, editors. *Williams Textbook of Endocrinology*. 13th ed. Philadelphia: Elsevier; 2016. p. 334–68.

71. Flamant F, Cheng SY, Hollenberg AN, Moeller LC, Samarut J, Wondisford FE, et al. Thyroid hormone signaling pathways: time for a more precise nomenclature. *Endocrinology*. 2017;158:2052–7.
72. Pillai S, Debono M. Physiology of the pituitary, thyroid, parathyroid and adrenal glands. *Surgery (Oxford)*. 2020;38:763–78.
73. Chaker L, Bianco AC, Jonklaas J, Peeters RP. Hypothyroidism. *The Lancet*. 2017;390:1550–62.
74. Darmowidjojo B, Antika LD. Subclinical thyroid dysfunction: diagnosis and management. *eJKI*. 2018;6:140–50.
75. Taylor PN, Albrecht D, Scholz A, Gutierrez-Buey G, Lazarus JH, Dayan CM, et al. Global epidemiology of hyperthyroidism and hypothyroidism. *Nat Rev Endocrinol*. 2018;14:301–16.
76. Ajmani SN, Aggarwal D, Bhatia P, Sharma M, Sarabhai V, Paul M. Prevalence of overt and subclinical thyroid dysfunction among pregnant women and its effect on maternal and fetal outcome. *J Obstet Gynaecol India*. 2014;64:105–10.
77. Jonklaas J, Cooper DS. The Laboratory and imaging approaches to thyroid disorders. In: Cooper DS, Sipos JA, editors. *Medical Management of Thyroid Disease*. 3rd ed. Florida: CRC Press; 2019. p. 1–35.
78. Frohlich E, Wahl R. Thyroid autoimmunity: role of anti-thyroid antibodies in thyroid and extra-thyroidal diseases. *Front Immunol*. 2017;8:521.
79. Chaker L, Cappola AR, Mooijaart SP, Peeters RP. Clinical aspects of thyroid function during ageing. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2018;6:733–42.
80. Taylor PN, Lazarus JH. Hypothyroidism in pregnancy. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2019;48:547–56.
81. Patrick L. Thyroid disruption: mechanisms and clinical implications in human health. *Altern Med Rev*. 2009;14:326–46.
82. Calsolaro V, Pasqualetti G, Niccolai F, Caraccio N, Monzani F. Thyroid disrupting chemicals. *Int J Mol Sci*. 2017;18:2583.
83. Fortenberry GZ, Hu H, Turyk M, Barr DB, Meeker JD. Association between urinary 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol, a metabolite of chlorpyrifos and chlorpyrifos-methyl, and serum T4 and TSH in NHANES 1999-2002. *Sci Total Environ*. 2012;424:351–5.
84. Lacasana M, Lopez-Flores I, Rodriguez-Barranco M, Aguilar-Garduno C, Blanco-Munoz J, Perez-Mendez O, et al. Association between organophosphate pesticides exposure and thyroid hormones in floriculture workers. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010;243:19–26.
85. Bernieri T, Rodrigues D, Barbosa IR, Ardenghi PG, Basso da Silva L. Occupational exposure to pesticides and thyroid function in Brazilian soybean farmers. *Chemosphere*. 2019;218:425–9.

86. Peck EC, Eaton DL. Genetic polymorphism and susceptibility to pesticides. In: Krieger R, editor. *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*. 3rd ed. London: Elsevier's Science & Technology; 2010. p. 525–49.
87. Freedman DB, Halsall D, Marshall WJ, Ellerviknot C. Thyroid disorders. In: Rifai N, editor. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 6th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Health Sciences; 2018. p. 1572–616.e13.
88. Gangemi S, Miozzi E, Teodoro M, Briguglio G, De Luca A, Alibrando C, et al. Occupational exposure to pesticides as a possible risk factor for the development of chronic diseases in humans (Review). *Mol Med Rep*. 2016;14:4475–88.
89. Farokhi F, Taravati A. Pesticide exposure and thyroid function in adult male sprayers. *Int J Med Invest*. 2014;3:127–32.
90. Shady A, El-deen F. Effect of chlorpyrifos on thyroid gland of adult male albino rats. *Egypt J Histol*. 2010;33:441–50.
91. Jain RB. Association between thyroid function and urinary levels of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol: data from NHANES 2007–2008. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2017;24:2820–26.
92. Kecamatan Tawangmangu: Pemerintah Kabupaten Karanganyar; 2010 [updated December 27, 2010; accessed January, 2021]. Available from: <https://www.karanganyarkab.go.id/20101227/kecamatan-tawangmangu/>.
93. Magelang BPSK. Kecamatan Kaliangkrik Dalam Angka 2020. Magelang: BPS Kabupaten Magelang; 2020.
94. Panduan budidaya bawang putih. Malang: Kementerian Pertanian - Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Jawa Timur; 2018.
95. Bu G, Fan J, Yang M, Lv C, Lin Y, Li J, et al. Identification of a novel functional corticotropin-releasing hormone (CRH2) in chickens and its roles in stimulating pituitary TSHbeta expression and ACTH secretion. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10:595.
96. Yang FW, Zhao GP, Ren FZ, Pang GF, Li YX. Assessment of the endocrine-disrupting effects of diethyl phosphate, a nonspecific metabolite of organophosphorus pesticides, by in vivo and in silico approaches. *Environ Int*. 2020;135:105383.
97. Brent GA, Weetman AP. Hypothyroidism and thyroiditis. In: Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Kronenberg HM, editors. *William Textbook of Endocrinology*. 13th ed. Philadelphia: Elsevier; 2016. p. 416–48.
98. Pearce EN. Thyroid disruptors. In: Braverman L, Cooper D, editors. *Werner & Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text*. 10th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 835–44.
99. LeBeau AL, Johnson GT, McCluskey JD, Harbison RD. Evaluation of urinary pesticide biomarkers among a sample of the population in the United States. *J Clin Toxicol*. 2012;55:003.

100. CDC. Laboratory procedure manual. Iodine and mercury in urine: NHANES 2011-2012- Method 3002.12005.
101. Smith JN, Wang J, Lin Y, Timchalk C. Pharmacokinetics of the chlorpyrifos metabolite 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCPy) in rat saliva. *Toxicol Sci.* 2010;113:315–25.
102. CDC. Laboratory procedure manual. Urinary pyrethroids, herbicides, and OP metabolites in urine. NHANES 2007-2008-Method 6103.03.2013.
103. Thomas KW, Dosemeci M, Coble JB, Hoppin JA, Sheldon LS, Chapa G, et al. Assessment of a pesticide exposure intensity algorithm in the agricultural health study. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 2010;20:559–69.
104. Seesen M, Lucchini RG, Siriruttanapruk S, Sapbamrer R, Hongsihsong S, Woskie S, et al. Association between Organophosphate Pesticide Exposure and Insulin Resistance in Pesticide Sprayers and Nonfarmworkers. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17:8140.
105. Aguilar-Garduno C, Blanco-Munoz J, Roxana Antonio K, Escamilla-Nunez C, Juarez-Perez CA, Schilmann A, et al. Occupational predictors of urinary dialkyl phosphate concentrations in Mexican flower growers. *Int J Occup Environ Health.* 2017;23:151–9.
106. Koureas M, Tsakalof A, Tzatzarakis M, Vakonaki E, Tsatsakis A, Hadjichristodoulou C. Biomonitoring of organophosphate exposure of pesticide sprayers and comparison of exposure levels with other population groups in Thessaly (Greece). *Occup Environ Med.* 2014;71:126–33.
107. Coble J, Thomas KW, Hines CJ, Hoppin JA, Dosemeci M, Curwin B, et al. An updated algorithm for estimation of pesticide exposure intensity in the agricultural health study. *Int J Environ Res Public Health.* 2011;8:4608–22.
108. Thomas KW, Dosemeci M, Hoppin JA, Sheldon LS, Croghan CW, Gordon SM, et al. Urinary biomarker, dermal, and air measurement results for 2,4-D and chlorpyrifos farm applicators in the Agricultural Health Study. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 2010;20:119–34.
109. Maden E, Wulansari M, Koomen I. Occupational pesticide exposure in vegetable production: A literature and policy review with relevance to Indonesia. Netherlands: vegIMPACT; 2014.
110. Okonya JS, Kroschel J. A cross-sectional study of pesticide use and knowledge of smallholder potato farmers in Uganda. *Biomed Res Int.* 2015;2015:759049.
111. Kapeleka JA, Sauli E, Sadik O, Ndakidemi PA. Biomonitoring of acetylcholinesterase (AChE) Activity among smallholder horticultural farmers occupationally exposed to mixtures of pesticides in Tanzania. *J Environ Public Health.* 2019;2019:3084501.
112. Damalas CA, Koutroubas SD. Farmers' exposure to pesticides: toxicity types and ways of prevention. *Toxics.* 2016;4:1.

113. Macfarlane E, Carey R, Keegel T, El-Zaemay S, Fritschi L. Dermal exposure associated with occupational end use of pesticides and the role of protective measures. *Saf Health Work*. 2013;4:136–41.
114. Barron Cuenca J, Tirado N, Vikstrom M, Lindh CH, Stenius U, Leander K, et al. Pesticide exposure among Bolivian farmers: associations between worker protection and exposure biomarkers. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. 2020;30:730–42.
115. Yuantari MG, Van Gestel CA, Van Straalen NM, Widianarko B, Sunoko HR, Shobib MN. Knowledge, attitude, and practice of Indonesian farmers regarding the use of personal protective equipment against pesticide exposure. *Environ Monit Assess*. 2015;187:142.
116. NIOSH. Hierarchy of controls: The National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH); 2015 [updated January 13, 2015; accessed April, 2021]. Available from: <https://www.cdc.gov/niosh/topics/hierarchy/default.html>.
117. Garrigou A, Laurent C, Berthet A, Colosio C, Jas N, al. e. Critical review of the role of PPE in the prevention of risks related to agricultural pesticide use. *Saf Sci*. 2020;123:104527.
118. Callahan CL, Hamad LA, Olson JR, Ismail AA, Abdel-Rasoul G, Hendy O, et al. Longitudinal assessment of occupational determinants of chlorpyrifos exposure in adolescent pesticide workers in Egypt. *Int J Hyg Environ Health*. 2017;220:1356–62.
119. Sharifzadeh MS, Abdollahzadeh G, Damalas CA, Rezaei R, Ahmadyousefi M. Determinants of pesticide safety behavior among Iranian rice farmers. *Sci Total Environ*. 2019;651:2953–60.
120. Damalas CA, Koutroubas SD. Farmers' behaviour in pesticide use: A key concept for improving environmental safety. *Curr Opin Environ Sci Health*. 2018;4:27–30.
121. Li J, Dong L, Tian D, Zhao Y, Yang H, Zhi X, et al. Association between pesticide exposure intensity and self-rated health among greenhouse vegetable farmers in Ningxia, China. *PLoS One*. 2018;13:e0209566.
122. Schilman A, Lacasana M, Blanco-Munoz J, Aguilar-Garduno C, Salinas-Rodriguez A, Flores-Aldana M, et al. Identifying pesticide use patterns among flower growers to assess occupational exposure to mixtures. *Occup Environ Med*. 2010;67:323–9.
123. Suarez-Lopez JR, Nazeeh N, Kayser G, Suarez-Torres J, Checkoway H, Lopez-Paredes D, et al. Residential proximity to greenhouse crops and pesticide exposure (via acetylcholinesterase activity) assessed from childhood through adolescence. *Environ Res*. 2020;188:109728.
124. Farahat FM, Ellison CA, Bonner MR, McGarrigle BP, Crane AL, Fenske RA, et al. Biomarkers of chlorpyrifos exposure and effect in Egyptian cotton field workers. *Environ Health Perspect*. 2011;119:801–6.

125. Meeker JD, Barr DB, Ryan L, Herrick RF, Bennett DH, Bravo R, et al. Temporal variability of urinary levels of nonpersistent insecticides in adult men. *J Expo Anal Environ Epidemiol*. 2005;15:271–81.
126. Wang L, Liu Z, Zhang J, Wu Y, Sun H. Chlorpyrifos exposure in farmers and urban adults: Metabolic characteristic, exposure estimation, and potential effect of oxidative damage. *Environ Res*. 2016;149:164–70.
127. Li AJ, Kannan K. Urinary concentrations and profiles of organophosphate and pyrethroid pesticide metabolites and phenoxyacid herbicides in populations in eight countries. *Environ Int*. 2018;121:1148–54.
128. Nelson DR, Nebert DW. Cytochrome P450 (CYP) gene superfamily. *eLS*2018. p. 1–19.
129. Rendic SP, Guengerich FP. Human family 1-4 cytochrome P450 enzymes involved in the metabolic activation of xenobiotic and physiological chemicals: an update. *Arch Toxicol*. 2021;95:395–472.
130. Llop S, Murcia M, Iniguez C, Roca M, Gonzalez L, Yusa V, et al. Distributions and determinants of urinary biomarkers of organophosphate pesticide exposure in a prospective Spanish birth cohort study. *Environ Health*. 2017;16:46.
131. Li AJ, Chen Z, Lin TC, Buck Louis GM, Kannan K. Association of urinary metabolites of organophosphate and pyrethroid insecticides, and phenoxy herbicides with endometriosis. *Environ Int*. 2020;136:105456.
132. Hanson B, Bond C, Buhl K. Pesticide vapor pressure fact sheet. 2016. Available from: <http://npic.orst.edu/factsheets/vaporpressure.html>.
133. van der Spek AH, Fliers E, Boelen A. The classic pathways of thyroid hormone metabolism. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;458:29–38.
134. Mullur R, Liu YY, Brent GA. Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiol Rev*. 2014;94:355–82.
135. Baumgartner C, da Costa BR, Collet TH, Feller M, Floriani C, Bauer DC, et al. Thyroid function within the normal range, subclinical hypothyroidism, and the risk of atrial fibrillation. *Circulation*. 2017;136:2100–16.
136. Teumer A, Chaker L, Groeneweg S, Li Y, Di Munno C, Barbieri C, et al. Genome-wide analyses identify a role for SLC17A4 and AADAT in thyroid hormone regulation. *Nat Commun*. 2018;9:4455.
137. Ibrahim BA, Amer SA, Younis SE, Kofi MF, Abdel-Halim AW. Chronic pesticides exposure and thyroid functions among farmers in Almnaif District - Ismailia Governorate, Egypt. *SCU-MJ*. 2020;23:117–28.
138. Lerro CC, Koutros S, Andreotti G, Friesen MC, Alavanja MC, Blair A, et al. Organophosphate insecticide use and cancer incidence among spouses of pesticide applicators in the Agricultural Health Study. *Occup Environ Med*. 2015;72:736–44.

139. Kongtip P, Nankongnab N, Kallayanatham N, Pundee R, Choochouy N, Yimsabai J, et al. Thyroid hormones in conventional and organic farmers in Thailand. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16:2704.
140. Mulyantoro DK, Kusriani I, Hidayat T, Puspitasari C. Assessment of thyroid function and its association with free thyroxin hormone among pregnant women in areas with previous history iodine deficiency in Magelang, Indonesia. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2020;66:S474–8.
141. Businge CB, Longo-Mbenza B, Kengne AP. Mildly elevated thyroid-stimulating hormone is associated with endothelial dysfunction and severe preeclampsia among pregnant women with insufficient iodine intake in Eastern Cape province, South Africa. *Ann Med*. 2021;53:1082–8.
142. Leemans M, Couderq S, Demeneix B, Fini J-B. Pesticides with potential thyroid hormone-disrupting effects: a review of recent data. *Front Endocrinol*. 2019;10:743.
143. Zhang Y, Shi L, Zhang Q, Peng N, Chen L, Lian X, et al. The association between cigarette smoking and serum thyroid stimulating hormone, thyroid peroxidase antibodies and thyroglobulin antibodies levels in Chinese residents: A cross-sectional study in 10 cities. *PLoS One*. 2019;14:e0225435.
144. Okoffo ED, Mensah M, Fosu-Mensah BY. Pesticides exposure and the use of personal protective equipment by cocoa farmers in Ghana. *Environ Syst Res*. 2016;5:17.
145. Geleta DH, Alemayehu M, Asrade G, Mekonnen TH. Low levels of knowledge and practice of occupational hazards among flower farm workers in southwest Shewa zone, Ethiopia: a cross-sectional analysis. *BMC Public Health*. 2021;21:232.
146. Meeker JD, Barr DB, Hauser R. Thyroid hormones in relation to urinary metabolites of non-persistent insecticides in men of reproductive age. *Reprod Toxicol*. 2006;22:437–42.
147. Lerro CC, Beane Freeman LE, DellaValle CT, Kibriya MG, Aschebrook-Kilfoy B, Jasmine F, et al. Occupational pesticide exposure and subclinical hypothyroidism among male pesticide applicators. *Occup Environ Med*. 2018;75:79–89.
148. Paules MG, Zaher JF, Hafez EM, El-Tahawy NF. Toxicological effects induced by chlorpyrifos administration on thyroid and suprarenal glands in adult male albino rats. *Ain-Shams J Forensic Med Clin Toxicol*. 2013;20:99–105.
149. Akande MG, Shittu M, Uchendu C, Yaqub LS. Taurine ameliorated thyroid function in rats co-administered with chlorpyrifos and lead. *Vet Res Commun*. 2016;40:123–9.
150. Chebab S, Mekircha F, Leghouchi E. Potential protective effect of Pistacia lentiscus oil against chlorpyrifos-induced hormonal changes and oxidative damage in ovaries and thyroid of female rats. *Biomed Pharmacother*. 2017;96:1310–6.

151. Di Jeso B, Arvan P. Thyroglobulin from molecular and cellular biology to clinical endocrinology. *Endocr Rev.* 2016;37:2–36.
152. Miller DR, McClain ES, Dodds JN, Balinski A, May JC, McLean JA, et al. Chlorpyrifos disrupts acetylcholine metabolism across model blood-brain barrier. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;9:622175.
153. Warner GR, Mourikes VE, Neff AM, Brehm E, Flaws JA. Mechanisms of action of agrochemicals acting as endocrine disrupting chemicals. *Mol Cell Endocrinol.* 2020;502:110680.
154. Hazarika J, Ganguly M, Borgohain G, Baruah I, Sarma S, Bhuyan P, et al. Endocrine disruption: molecular interactions of chlorpyrifos and its degradation products with estrogen receptor. *Struct Chem.* 2020;31:2011–21.
155. Hazarika J, Ganguly M, Mahanta R. Molecular interactions of chlorpyrifos and its environmental degradation products with human sex hormone-binding globulin: an in silico study. *J Appl Toxicol.* 2019;39:1002–11.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Naskah Penjelasan untuk Subjek Penelitian

LEMBAR PENJELASAN KEPADA CALON SUBJEK

Selamat pagi, saya **dr. Liem Jen Fuk, Sp.Ok, MKK** peserta Program Studi S3 Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, akan melakukan penelitian berjudul: **“Biomonitoring pada Penyemprot Pestisida dengan Paparan Utama Klorpirifos: Analisis Interaksi Dosis Paparan Kumulatif, PON-1, Variasi Genetik CYP2B6 dan CYP2C19 Terhadap Kejadian Hipotiroid”**.

Kegiatan pertanian di Indonesia pada umumnya menggunakan pestisida dengan klorpirifos (CPF) merupakan pestisida dengan penggunaan tertinggi karena efektifitasnya terhadap serangga pengganggu dan secara ekonomis lebih terjangkau bagi sebagian besar petani. Klorpirifos merupakan bahan kimia yang biasa digunakan untuk membunuh hama seperti ulat bawang atau ulat grayak. Salah satu gangguan kesehatan utama akibat penggunaan CPF adalah penyakit gondok. Satu hingga 3 dari 8 petani yang terpajan pestisida dapat mengalami kekurangan hormon tiroid yang sangat dibutuhkan dalam hampir semua proses dalam tubuh manusia. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari hubungan antara penggunaan CPF dan aspek bawaan (genetik) terhadap kejadian penyakit gondok pada petani yang menggunakan pestisida. Jumlah peserta yang diharapkan dapat berpartisipasi dalam penelitian ini adalah 244 orang petani berusia 18-65 tahun yang terpajan dengan CPF selama bekerja dan berada dalam kondisi fisik terbaik.

Apabila anda bersedia berpartisipasi dalam penelitian ini, kami akan melakukan beberapa hal mulai dari melakukan wawancara untuk menanyakan data pribadi anda, riwayat kesehatan, riwayat kebiasaan yang anda jalani serta melakukan pengamatan terhadap lokasi kerja dan cara kerja yang anda lakukan. Kami juga akan melakukan pemeriksaan pada fisik (tubuh) anda di antaranya berupa keadaan umum, pengukuran tinggi dan berat badan, lingkaran pinggang, tekanan darah serta

pemeriksaan gondok. Selanjutnya kami akan melakukan pengambilan sampel darah dan air seni anda yang akan digunakan untuk menilai kondisi/risiko anda, kondisi kelenjar gondok, faktor keturunan (genetik), serta besarnya bahan kimia (pestisida CPF) yang masuk dalam tubuh anda. Keseluruhan darah yang akan diambil kira-kira sebanyak 1 sendok makan dari pembuluh darah di lipatan siku dan air seni sebanyak ¼ gelas air mineral. Pengambilan darah dan urin tersebut maksimal dilakukan pada 2 waktu yang berbeda dengan persiapan dan tatacara sesuai arahan yang diberikan oleh peneliti. Seluruh tindakan pengambilan darah ini pada dasarnya merupakan prosedur yang aman yang dilakukan dengan tata cara yang benar dan bebas hama oleh petugas terlatih sehingga tidak membahayakan anda. Namun demikian, pengambilan darah akan menimbulkan sedikit rasa tidak nyaman atau nyeri, dengan kemungkinan timbul kejadian ikutan setelah prosedur pengambilan darah berupa memar ringan di lokasi pengambilan darah hingga infeksi yang bila terjadi akan ditangani sebagaimana mestinya.

Keuntungan melalui keikutsertaan dalam penelitian ini adalah anda mendapatkan pemeriksaan kesehatan secara gratis. Seluruh biaya yang berkaitan dengan pemeriksaan kesehatan dalam penelitian ini akan ditanggung oleh peneliti. Penelitian ini akan bermanfaat bagi seluruh petani yang bekerja dengan pestisida berupa pengetahuan tentang upaya pencegahan dini munculnya gangguan gondok akibat CPF. Oleh karenanya kami sangat menghargai partisipasi dan kepedulian anda dalam mendukung perkembangan ilmu kedokteran khususnya di Indonesia.

Kami juga ingin menyampaikan bahwa hasil penelitian ini akan dilaporkan di forum ilmiah dan dalam bentuk publikasi pada jurnal ilmiah dalam maupun luar negeri tanpa mencantumkan identitas bapak/ibu/saudara. Semua informasi yang kami kumpulkan dalam penelitian ini akan dijaga kerahasiaannya. Keikutsertaan anda dalam penelitian ini bersifat sukarela, tanpa paksaan dari siapapun. Sebagai peserta penelitian ini, bapak/ibu/saudara berkewajiban untuk mengikuti arahan seperti yang tertulis di atas dan untuk kesediaan anda berpartisipasi dalam penelitian ini, peneliti menyediakan insentif berupa uang lelah sebesar Rp. 35.000,- yang akan diberikan 2 (dua) kali masing-masing pada sesi pengambilan darah/urin pertama dan sesi

konsultasi yang anda hadiri. Sebaliknya, bila karena satu dan lain hal anda tidak berkenan berpartisipasi, atau tidak dapat meneruskan partisipasi dalam penelitian ini atau merasa tidak lagi bersedia ikut, maka anda berhak untuk setiap saat mengundurkan diri dari kepesertaan penelitian ini tanpa syarat apapun. Bila ada hal lain yang belum jelas atau belum dimengerti dengan baik, maka anda dapat meminta penjelasan lebih lanjut kepada dr. Liem Jen Fuk (+62 819 05953919). Sekiranya anda menyetujui untuk turut berpartisipasi, maka diharapkan agar dapat menandatangani surat persetujuan setelah penjelasan untuk mengikuti penelitian ini. Atas kesediaan dan kerja samanya diucapkan terima kasih.

Lampiran 2. Lembar Persetujuan Keikutsertaan dalam Penelitian

LEMBAR PERSETUJUAN KEIKUTSERTAAN DALAM PENELITIAN

Semua penjelasan tersebut telah disampaikan kepada saya dan semua pertanyaan saya telah dijawab oleh **peneliti**. Saya mengerti bahwa bila memerlukan penjelasan, saya dapat menanyakan kepada **dr. Liem Jen Fuk**.

Sertifikat Persetujuan (<i>Consent</i>)	
Saya telah membaca semua penjelasan tentang penelitian ini. Saya telah diberikan kesempatan untuk bertanya dan semua pertanyaan saya telah dijawab dengan jelas. Saya bersedia untuk berpartisipasi pada studi penelitian ini dengan sukarela.	Saya mengkonfirmasi bahwa peserta telah diberikan kesempatan untuk bertanya mengenai penelitian ini, dan semua pertanyaan telah dijawab dengan benar. Saya mengkonfirmasi bahwa persetujuan telah diberikan dengan sukarela.
_____	_____
Nama subjek/wali	Nama peneliti/peminta persetujuan
_____	_____
Tanda tangan peserta studi	Tanda tangan peneliti/peminta persetujuan
Tanggal _____	0 0
hari/bulan/tahun	Tanggal _____
	hari/bulan/tahun

Informasi Peneliti:

Peneliti Utama: dr. Liem Jen Fuk, Sp.Ok, MKK
 Program Studi S3 Ilmu Kedokteran
 Jl. Salemba Raya No. 6, Jakarta Pusat, 10430
 081905953939 / (email: jenfuk.dr@gmail.com)

KEPK FKUI-RSCM: Jalan Salemba 6, Jakarta Pusat, 10430
 No. Telp: 021 3157008
 Email: ec_fkui@yahoo.com

Lampiran 3. Rincian Kegiatan

Rencana kegiatan pengambilan data penelitian dan ketentuan protokol kesehatan sesuai pembatasan sosial. Garis besar kegiatan pengambilan data penelitian terdiri dari sejumlah aktivitas sebagai berikut:

1. Observasi tempat kerja secara umum dan cara kerja subjek penelitian untuk menilai dosis pajanan kumulatif. Tidak semua lokasi dan cara kerja subjek dapat diidentifikasi mengingat keterbatasan tenaga, waktu dan jarak tempuh menuju lokasi kerja.
2. Memberikan penjelasan penelitian dan *informed consent* pada calon subjek
3. Pemeriksaan subjek penelitian:
 - Wawancara, pengisian kuesioner dan pemeriksaan fisik
 - Pengambilan spesimen darah vena dan urin (sampling pertama)
 - Konsultasi hasil pemeriksaan
 - Pengambilan spesimen darah vena dan urin (sampling kedua)

Pengambilan data penelitian ini dilakukan dengan senantiasa mempertimbangkan kondisi pandemi COVID-19 yang tengah terjadi dan oleh karenanya berlangsung dengan melakukan sejumlah protokol kesehatan di antaranya:

1. Melakukan pemantauan suhu tubuh pada setiap orang yang terlibat dalam kegiatan penelitian ini sebelum kegiatan berlangsung
2. Jumlah orang yang berkumpul selama pemeriksaan dalam satu tempat di satu waktu yang sama dibatasi dan dilakukan pengaturan jarak antar orang 1 - 2 meter.
3. Peneliti, anggota peneliti dan pendamping menerapkan kewaspadaan standar dan menggunakan alat pelindung diri yang sesuai di antaranya masker, sarung tangan, dan atau pelindung wajah.
4. Subjek penelitian mengenakan masker selama berlangsungnya kegiatan penelitian ini. Peneliti menyediakan masker kain atau masker medis di lokasi pemeriksaan, sehingga subjek yang berada di lokasi pemeriksaan tanpa masker diberi masker untuk langsung digunakan.

5. Menerapkan perilaku cuci tangan untuk menjaga kebersihan tangan tim peneliti dan subjek penelitian. Untuk itu, peneliti mengusahakan ketersediaan air bersih di tempat penelitian dan menyediakan *hand sanitizer* sebagai alternatif untuk dipergunakan selama penelitian.
6. Menjaga kebersihan dan higienitas lokasi penelitian.

Sosialisasi kegiatan

Koordinasi dengan koordinator petani (paguyuban) untuk menemui petani sebagai calon subjek di lokasi lain yang disediakan.

1. Peneliti memperkenalkan diri dan timnya
2. Calon subjek diberikan lembar penjelasan penelitian (lampiran 1) dan lembar persetujuan setelah penjelasan (*informed consent*) pada lampiran 2
3. Peneliti membacakan informasi yang tertulis dalam lembar penjelasan penelitian dan memberikan penjelasan mengenai penelitian yang akan dilakukan. Peneliti juga menjelaskan bahwa setiap subjek penelitian yang berpartisipasi dalam penelitian akan menjalani wawancara, pemeriksaan fisik dan pemeriksaan laboratorium berupa pengambilan darah dan urin sewaktu sebanyak maksimal sebanyak 2 kali pada waktu yang ditentukan.
4. Peneliti memberikan kesempatan kepada subjek untuk bertanya dan memberikan jawaban sesuai pertanyaan yang diajukan
5. Peneliti meminta kepada seluruh calon subjek yang bersedia berpartisipasi lebih lanjut untuk mengisi dan menandatangani lembar *informed consent* serta mengembalikannya kepada peneliti.

Sesi pemeriksaan pertama

1. Subjek penelitian tiba di lokasi pemeriksaan dan diterima oleh dokter/petugas registrasi untuk kemudian didaftarkan sebagai peserta harian.
2. Dokter dibantu oleh 1 petugas lainnya melakukan wawancara, pemeriksaan tekanan darah, tinggi badan, berat badan, perabaan tiroid.
3. Subjek kemudian diarahkan ke pemeriksaan laboratorium. Petugas phlebotomis menanyakan identitas subjek penelitian, kemudian mengambil

tabung dan jarum yang masih baru lalu menunjukkannya kepada subjek penelitian.

4. Petugas kemudian menempelkan label identitas subjek pada tabung tersebut dan sekali lagi menunjukkan tabung tersebut kepada subjek untuk memastikan bahwa label yang ditempelkan merupakan label identitas yang benar.
5. Dilakukan pengambilan darah oleh petugas phlebotomis dan kemudian sampel darah dteruskan ke meja distribusi sampel.
6. Subjek diberi pot urin dan juga diberikan informasi mengenai cara menampung urin. Setelah subjek menampung urin, pot dikembalikan ke petugas dan di beri label nama.
7. Subjek penelitian yang telah diambil darah dan mengumpulkan urin kemudian memperoleh pengganti uang lelah dan diberi informasi tentang jadwal kedatangan berikutnya.
8. Petugas distribusi sampel melakukan pencatatan waktu pengambilan darah dalam log yang tersedia, kemudian melakukan sentrifuse spesimen darah dan memisahkan serum dan endapannya.
9. Sampel darah dan urin kemudian dimasukkan dalam ice box kemudian dikirim ke laboratorium pemeriksa.

Sesi pemeriksaan kedua + konsultasi

1. Subjek penelitian datang untuk menerima informasi tentang hasil pemeriksaan pertama. Setelah diberikan penjelasan oleh dokter mengenai hasil tersebut, subjek yang memenuhi persyaratan dan tetap ingin berpartisipasi dalam penelitian diminta untuk melakukan kembali pemeriksaan laboratorium.
2. Data riwayat pekerjaan dan riwayat medis yang belum lengkap atau memerlukan klarifikasi telah dikonfirmasi pada tahap ini.
3. Petugas phlebotomis menanyakan identitas subjek penelitian, kemudian mengambil tabung dan jarum yang masih baru lalu menunjukkannya kepada subjek penelitian.

4. Petugas kemudian menempelkan label identitas subjek pada tabung tersebut dan sekali lagi menunjukkan tabung tersebut kepada subjek untuk memastikan bahwa label yang ditempelkan merupakan label identitas yang benar.
5. Dilakukan pengambilan darah oleh petugas phlebotomis dan kemudian sampel darah diteruskan ke meja distribusi sampel.
6. Petugas kemudian memberikan pot urin dan menjelaskan kembali cara penampungan urin kepada subjek penelitian.
7. Subjek penelitian yang telah diambil darah dan mengumpulkan pot urin kemudian melapor ke petugas registrasi dan memperoleh pengganti uang lelah kemudian diberi informasi bahwa keseluruhan prosedur telah selesai.
8. Petugas distribusi sampel melakukan pencatatan waktu pengambilan darah dalam log yang tersedia, kemudian melakukan sentrifuse spesimen darah dan memisahkan serum, *buffy coat*, dan endapannya.
9. Petugas distribusi sampel mengelompokkan spesimen darah dan urin sesuai kebutuhan parameter pemeriksaannya
 - a. Pemeriksaan CYP2C19 dan CYP2B6 dikerjakan di Laboratorium Klinik Prodia
 - b. Pemeriksaan TCPy, AChE dan PON-1 dikerjakan di Prodia Industrial Toxicology Laboratory
 - c. Pemeriksaan TSHs, FT4, Tiroglobulin dikerjakan di Prodia OHC Cikarang
10. Sampel darah dan urin kemudian dimasukkan dalam ice box kemudian dikirim ke Lab pemeriksa.

Lampiran 4. Pemeriksaan Kimia Rutin (Glukosa, ALT, AST, Kreatinin)

Pemeriksaan glukosa

Pemeriksaan ini dilakukan untuk menentukan kadar glukosa dalam serum, plasma, atau urin manusia dengan sistem fotometrik menurut metode tes UV enzimatis heksokinase menggunakan reagen diagnostik in vitro Proline Glucose Hexokinase FS pada alat Proline R-910. Pemeriksaan dilakukan sesuai dengan protokol pabrikan dengan batas bawah deteksi 2 mg/dL.

Pemeriksaan ALT dan AST

Pemeriksaan ini dilakukan untuk menentukan kadar enzim *alanine aminotransferase* (ALT), sebelumnya disebut *glutamic pyruvic transaminase* (GPT) dan *aspartate aminotransferase* (AST), sebelumnya disebut *glutamic oxaloacetic transaminase* (GOT) dalam serum atau plasma manusia dengan sistem fotometrik menurut metode tes UV Optimal dari modifikasi IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*) menggunakan reagen diagnostik in vitro Proline ALAT (GPT) FS pada alat Proline R-910. Pemeriksaan dilakukan sesuai dengan protokol pabrikan dengan batas bawah deteksi 4 U/L (ALT) dan 2 U/L (AST).

Pemeriksaan kreatinin

Pemeriksaan ini dilakukan untuk menentukan kadar kreatinin dalam serum, plasma, atau urin manusia dengan sistem fotometrik menurut metode tes kolorimetrik enzimatis menggunakan reagen diagnostik in vitro Proline Creatinine PAP FS pada alat Proline R-910. Pemeriksaan dilakukan sesuai dengan protokol pabrikan dengan batas bawah deteksi 0.03 mg/dL.

Lampiran 5. Pemeriksaan Yodium Urin

Prinsip pemeriksaan:

Pengukuran konsentrasi elemen Iodine dari urine manusia yang diekstrak menggunakan larutan basa. Sampel Urine yang telah terekstrak kemudian dinebulisasi agar menjadi droplet mengalami desolvasi dan ionisasi dengan bantuan energi dari plasma argon sehingga dapat dianalisis oleh sistem mass spectrometry.

Metode: Modifikasi metode CDC 3002.1¹⁰⁰ menggunakan alat *Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry* (ICP-MS)

Sampel: urine dengan stabilitas hingga 2 bulan pada suhu ruang, suhu dingin, dan beku

Reagen:

- i. Standard Iodine (Merck, Jerman)
- ii. Standard Tellurium (Te) (Merck, Jerman)
- iii. HNO₃ Suprapur (Merck, Jerman)
- iv. Triton X-100 (Roche, Jerman)
- v. TMAH 25% (Merck, Jerman)

Kontrol: Jenis ClinCheck Urine Control Trace Element (Recipe, Germany) Cat. 8849

Kalibrator: Jenis Standar Kalium Iodida (KI) (Merck, Jerman)

Alat: Agilent ICP-MS 7700x

Langkah kerja:

A. Instrumen dan reagen

- i. Hidupkan instrumen ICP-MS dan aktifkan program ICP-MS instrument control
- ii. Siapkan larutan basa yang terdiri atas 4mL TMAH 25%, 10 uL Triton X-100, dan tambahkan 100 mL ultrapure water.
- iii. Bilas saluran sampel dengan rinse iodine yang terdiri dari 4 mL TMAH 25%, 100 uL triton x-100, dan tambahkan 100 mL ultrapure water. Kemudian

washing solution yang terdiri dari 3mL HNO₃ 65% dan ditambahkan 100 mL ultrapure water.

- iv. Hidupkan plasma argon, biarkan selama 20 menit kemudian lakukan tuning dengan larutan khusus (Tuning Solution for ICP-MS, Agilent Technologies, 5085-5959)
- v. Buat batch sesuai dengan panel yang akan dikerjakan yang parameternya sama dengan hasil tuning pada poin (iv).

B. Preparasi Standard & Internal Standard

- i. Siapkan stok standard Kalium Iodida (KI) dengan konsentrasi 2000 ug/L dan Tellurium 1000mg/L.
- ii. Buat serial standard sebanyak 7 level dengan konsentrasi standard KI (Merck) konsentrasi 25 - 2000 µg/L yang setara dengan Iodine 14.63 - 1170.96 µg/L dengan menggunakan larutan basa untuk element Iodine yang telah disiapkan.
- iii. Siapkan internal standard Tellurium (Te) dengan konsentrasi 10 ug/L melalui pengenceran stok standar Te 10 ug/L dengan menggunakan larutan basa.
- iv. Homogenisasi dengan vorteks dan letakkan vial untuk setiap level kalibrasi di instrument untuk diinjeksikan. Letakkan tabung Tellurium pada saluran khusus internal standard.

C. Preparasi kontrol dan sampel

- i. Ambil sebanyak 40 uL bahan kontrol urine level 1 dan 2 kemudian tambahkan 1800 uL larutan basa dan 160 uL ultrapure water, homogenkan dengan vorteks, letakkan pada instrumen untuk diinjeksikan.
- ii. Ambil sebanyak 40 uL sampel urine kemudian tambahkan 1800 uL larutan basa dan 160 uL ultrapure water, homogenkan dengan vorteks, letakkan pada instrumen untuk diinjeksikan.

D. Analisis Data dan perhitungan konsentrasi

- i. Buat kurva kalibrasi dengan mengaplikasikan respons kelimpahan ion relatif yang terbaca detektor yang akan berkorelasi positif dengan konsentrasi.
- ii. Masukkan perhitungan internal standard sehingga diperoleh konsentrasi akhir yang telah terkoreksi internal standard.

Lampiran 6. Pemeriksaan Fungsi Tiroid (TSH, FT4, Tiroglobulin)

Pemeriksaan TSH

Pemeriksaan ini dilakukan untuk menentukan kadar *Thyroid Stimulating Hormone* (TSH) di dalam serum atau plasma manusia berbasis teknologi *electrochemiluminescence immunoassay* (ECLIA) menggunakan reagen diagnostik Elecsys TSH pada alat Roche Cobas e-411.

Pemeriksaan dilakukan sesuai dengan protokol pabrikan dengan batas deteksi 0.005 – 100 mIU/L.

Pemeriksaan FT4

Pemeriksaan ini dilakukan untuk menentukan kadar *free-thyroxine* (FT4) di dalam serum atau plasma manusia berbasis teknologi *electrochemiluminescence immunoassay* (ECLIA) menggunakan reagen diagnostik Elecsys FT4 III pada alat Roche Cobas e-411.

Pemeriksaan dilakukan sesuai dengan protokol pabrikan dengan batas deteksi 0.04 – 7.77 ng/dL.

Pemeriksaan tiroglobulin

Pemeriksaan ini dilakukan untuk menentukan kadar tiroglobulin di dalam serum atau plasma manusia berbasis teknologi *electrochemiluminescence immunoassay* (ECLIA) menggunakan reagen diagnostik Elecsys Tg II pada alat Roche Cobas e-411. Pemeriksaan dilakukan sesuai dengan protokol pabrikan dengan batas deteksi 0.04 – 500 ng/mL.

Lampiran 7. Pemeriksaan Polimorfisme CYP2B6

Analisis CYP2B6 – 516G>T (rs3745274)

Ekstraksi DNA dilakukan terhadap specimen *whole blood* menggunakan *spin column method* berdasarkan protokol pabrikan (Genomic DNA Mini Kit GB100 – Geneaid Biotech Ltd., Taiwan). Pengujian kemurnian dan kuantifikasi ekstrak DNA dilakukan menggunakan *One Spectrometer* dari NanoDrop™ (Termo Fischer Scientific Inc., Amerika Serikat). Ekstrak DNA disimpan pada suhu -20°C hingga digunakan.

Reagen yang dipergunakan diperuntukkan hanya bagi penelitian (*research use only*). Primer TaqMan® SNP Genotyping Assay C__7817765_60 (Applied Biosystems, CA, USA) dan thermocycler Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH, Germany). Master mix PCR TaqMan GTXpress Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA). *TaqMan probe* dipergunakan untuk menentukan genotip CYP2B6 516G>T berdasarkan sinyal fluoresens (Fam dan VIC) sesuai protokol pabrikan. Sebanyak 6 sampel menjalani pemeriksaan DNA sekuensing di 1st BASE DNA Sequencing Division, Apical Scientific Sdn Bhd, Selangor, Malaysia menggunakan PCR product 533bp sebagai bagian dari validasi hasil pemeriksaan di atas.

Analisis CYP2B6 – 785A>G (rs2279343)

Genotipe CYP2B6 – 785A>G (rs2279343) dianalisis dengan menggunakan metode *Sanger sequencing*. Sampel diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer seperti yang digambarkan dalam studi sebelumnya oleh Zakeri et.al.⁵³ dan menghasilkan produk PCR 640 bp. Seluruh metode sekuensing dikerjakan oleh 1st BASE DNA Sequencing Division, Apical Scientific Sdn Bhd, Selangor, Malaysia.

Lampiran 8. Pemeriksaan Polimorfisme CYP2C19 Genotipe *2 dan *3

METODE:

PCR + Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Goldstein and Blaisdell

Serum

1. Jenis: Whole Blood
2. Volume: 5 mL
3. Stabilitas: 72 jam pada suhu ruang, 7 hari pada suhu 2-8 °C, tidak boleh dibekukan.
4. Penanganan awal sampel → Pemisahan Buffy Coat
 - a. Sentrifuse whole blood pada 3000 rpm selama 15 menit.
 - b. Buang plasma dengan menggunakan pipet secara hati-hati.
 - c. Ambil ± 300 µL buffy coat berupa lapisan putih pada bagian antara plasma dan sel darah merah dengan menggunakan pipet secara hati-hati, pindahkan ke dalam tabung mikrosentrifuse 1.5 mL.

Reagen:

Reagen Ekstraksi:

1. High Pure PCR Template Preparation Kit
2. Proteinase K
3. Inhibitor Removal Buffer
4. Wash buffer

Reagen Amplifikasi:

1. Kapa Taq DNA Polymerase
2. 100 mM dNTP set
3. Primer Liofilisat

Genotyping:

- CYP2C19*2: SmaI Enzyme
- CYP2C19*3: BamHI Enzyme

Gel Elektroforesis:

- TAE buffer 10X
- Ladder 100 bp + Loading Dye
- Agarose

- Ethidium Bromide

Kontrol:

- Kontrol Negatif: PCR hanya air tanpa template DNA
- Kontrol Positif

Alat

Ekstraksi

- Waterbath/Heating Block
- Vortex
- Mikrosentrifuse rotor 1.5 mL dengan kecepatan 8000xg dan 20.000xg
- Timer

Amplifikasi:

- Veriti Thermal Cycler / GeneAmp PCR System 2400

Deteksi:

- Neraca Analitik OHAUSS
- Perangkat gel elektroforesis
- Gel Documentation XR

Prinsip Pemeriksaan

CYP2C19 genotipe *2 dan *3 merupakan pemeriksaan genotipe menggunakan prinsip PCR-RFLP berdasarkan pada hilang atau munculnya suatu situs restriksi khusus akibat perubahan pada urutan DNA.

Tahapan reaksi pemeriksaan CYP2C19 adalah:

1. Isolasi spesimen untuk mendapatkan asam nukleat
2. Amplifikasi dan deteksi menggunakan gel agarosa
3. RFLP dan deteksi menggunakan gel agarosa.

Pada tahap RFLP, hasil PCR ditambahkan enzim restriksi/ endonuclease yang sesuai sehingga akan menghasilkan potongan/ fragmen DNA dengan panjang yang berbeda, yang kemudian diidentifikasi menggunakan gel elektroforesis.

Prosedur Pemeriksaan**A. Ekstraksi → berapa konsentrasi konten DNA (260nm), berapa pengotor (kontaminan)**

1. Siapkan tabung mikrosentrifuse 1.5 mL (3), Collection Tube (4), dan High Pure Filter Tube (1), untuk setiap sampel yang akan dikerjakan menjadi satu set pada rak tabung.
2. Pipet ke dalam tabung 1.5 mL secara berturut-turut: 200 μ L buffy coat, 200 μ L Binding Buffer, dan 40 μ L Proteinase K (yang sudah dilarutkan sebelumnya). Vortex segera dan inkubasi pada suhu 70 °C selama 15 menit.
3. Spin down untuk menurunkan semua cairan pada dinding tabung.
4. Tambahkan Isopropanol. Vortex sekitar 15 detik. Spindown.
5. Masukkan satu High Filter Tube untuk setiap sampel ke dalam Collection Tube.
6. Pindahkan sampel sebanyak 540 μ L ke dalam High Filter Tube. Sentrifuse pada 8000xg selama 1 menit.
7. Pindahkan Filter Tube dari Collection Tube yang berisi filtrat dan ganti dengan Collection Tube yang baru.
8. Tambahkan 500 μ L Inhibitor Removal Buffer. Sentrifuse pada 8000xg selama 1 menit.
9. Pindahkan Filter Tube dari Collection Tube yang berisi filtrat dan ganti dengan Collection Tube yang baru.
10. Tambahkan 500 μ L Wash Buffer. Sentrifuse pada 8000xg selama 1 menit.
11. Pindahkan Filter Tube dari Collection Tube yang berisi filtrat dan ganti dengan Collection Tube yang baru.
12. Tambahkan 500 μ L Wash Buffer. Sentrifuse pada 8000xg selama 1 menit.
13. Buang filtrat dalam Collection Tube tanpa mengganti Collection Tube. Sentrifuse pada kecepatan penuh selama 10 detik.
14. Buang Collection Tube yang berisi filtrat dan ganti dengan tabung mikrosentrifuse 1.5 mL.
15. Tambahkan 50 μ L Elution Buffer yang telah diinkubasi pada 70 °C. Sentrifuse pada 8000xg selama 1 menit.
16. Ulangi langkah 15.

17. Lakukan pengukuran hasil ekstraksi dengan menggunakan Nanodrop.
18. Aliquot supernatan (ekstrak DNA) menjadi 2 tabung @ 50 μ L ke dalam tabung 1.5 mL.
19. Gunakan segera Ekstrak DNA untuk proses amplifikasi atau simpan pada 2-8 °C selama 24 jam atau -70 °C untuk penyimpanan yang lebih lama.

B. Amplifikasi

Pembuatan Master Mix Amplifikasi

1. Siapkan 2 tabung mikrosentrifuse 0.5 mL masing-masing untuk membuat mastermix amplifikasi CYP2C19*2 dan CYP2C19*3.
2. Masukkan komponen master mix dengan volume sesuai pada tabel master mix amplifikasi ke dalam tabung mikrosentrifuse 0.5 mL dimulai dengan water. Up and down agar homogen.
3. Siapkan Tabung PCR 0.2 mL sebanyak sampel ditambah 1 kontrol Positif dan 1 kontrol negatif masing-masing untuk CYP2C19*2 dan CYP2C19*3.
4. Aliquot @ 24 μ L master mix ke dalam masing-masing tabung PCR 0.2 mL.

MASTER MIX AMPLIFIKASI

No	Nama Reagen	Konsentrasi Stok Reagen	Konsentrasi Akhir	Volume per reaksi (uL)	Volume 3 tes (uL)	Volume 5 tes (uL)
1	Buffer PCR 10x (+MgCl ₂) + d	10 X	1 X	3	10.5	16.5
2	dNTP mix 10 mM	10 mM	0.1 mM	0.3	1.05	1.65
3	Forward primer	20 uM	0.4 uM	0.6	2.1	3.3
4	Reverse primer	20 uM	0.4 uM	0.6	2.1	3.3
5	Kapa Taq Polymerase	5 unit / uL	0.6 unit	0.12	0.42	0.66
6	PCR Grade Water	-	-	19.38	67.83	106.59
	Total Volume			24	84	132

Amplifikasi PCR untuk CYP2C19*2 dilakukan dengan menggunakan primer sebagai berikut:

Forward: 5'-CAGAGCTTGGCATATTGTATC-3'

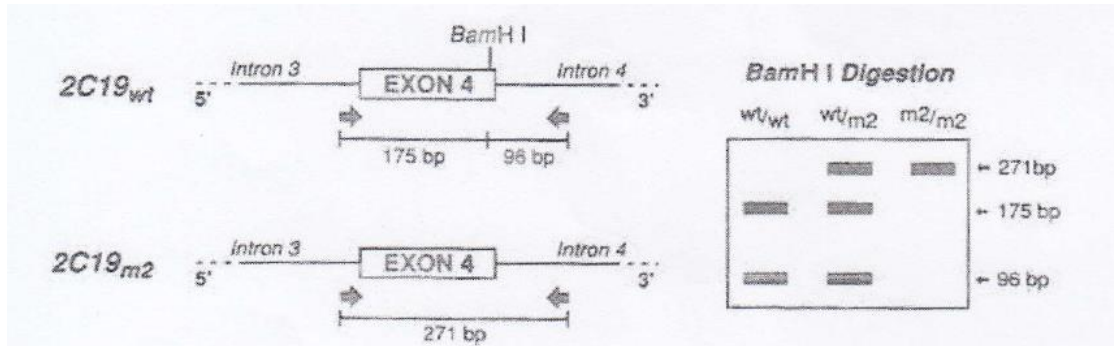
Reverse: 5'-GTAAACACACA ACTAGTCAATG-3'

Primer untuk analisis CYP2C19*3 adalah:

Forward: 5'-AAATTGTTTCCAATCATTTAGCT-3'

Reverse: 5'-ACTTCAGGGCTTGGTCAATA-3'

Primer *2 terletak di antara intron 4 dan intron 5, dengan enzim SmaI memotong di exon 5. Primer *3 terletak pada intron 3 dan intron 4 dengan enzim BamHI memotong di exon 4.



C. Deteksi dengan Gel Elektroforesis

Lakukan Pembuatan Gel Agarose 2% → Proses Elektroforesis

1. Siapkan parafilm.
2. Pipet 5 μ L Ladder 100 bp ke atas parafilm, campur dengan 1 μ L Loading Dye dengan cara Up and down beberapa kali. Pipet ke dalam sumur gel.
3. Campur 5 uL produk PCR sampel dengan 1 uL loading dye seperti di atas. Pipet ke dalam sumur gel dimulai dari lajur kiri pertama dan seterusnya.
4. Atur proses elektroforesis pada 25 menit dan 100 V.

D. Genotyping

Pembuatan Master Mix Genotyping

1. Siapkan 2 tabung mikrosentrifuse 0.5 mL masing-masing untuk membuat mastermix genotyping CYP2C19*2 dan CYP2C19*3.
2. Masukkan komponen master mix dengan volume sesuai pada tabel master mix genotyping secara berurutan ke dalam tabung mikrosentrifuse 0.5 mL
3. Up and down agar homogen.

MASTER MIX GENOTYPING 2C19*2

No	Nama Reagen	Konsentrasi Stok Reagen	Konsentrasi Akhir	Volume per reaksi (uL)	Volume 2 tes (uL)	Volume 4 tes (uL)
1	Enzyme SmaI	20 unit / uL	0.5 unit	0.5	1.25	2.25
2	Buffer M 10X No. 4	10 X	1 X	2	5	9
3	H2O	-	-	7.5	18.75	33.75
	Total Volume			10	25	45

* Jumlah master mix per jumlah tes sudah dilebihkan 0.5 reaksi

MASTER MIX GENOTYPING 2C19*3

No	Nama Reagen	Konsentrasi Stok Reagen	Konsentrasi Akhir	Volume per reaksi (uL)	Volume 2 tes (uL)	Volume 4 tes (uL)
1	Enzyme BamHI	20 unit / uL	1 unit	1	2.5	4.5
2	Buffer M 10X No. 3	10 X	1 X	2	5	9
3	BSA	100 X	1 X	0.2	0.5	0.9
4	H2O	-	-	6.8	17	30.6
	Total Volume			10	25	45

* Jumlah master mix per jumlah tes sudah dilebihkan 0.5 reaksi

Lampiran 9. Prosedur Pemeriksaan AChE Eritrosit

Pemeriksaan dilakukan oleh Prodia Industrial Toxicology Laboratory.

Alat:

- Fotometer yang dapat mengukur pada panjang gelombang 400 - 440 nm
- Kuvet dengan ketebalan 1 cm, disposibel
- Centrifuge
- Tabung centrifuge, 5 ml
- Mikropipet 10, 100 dan 1000 μL , dapat disesuaikan berikut tip pipet yang sesuai
- Vortex
- Stopwatch
- Water bath yang dapat disesuaikan pada suhu 25

Bahan:

- Reagen Ellmann
- 5.5-Dithio-bis-2-nitrobenzoic
- Asetilkolin iodide
- MiliQ
- Larutan salin fisiologis
- Dapar fosfat pH 7.2

Prinsip Kerja

Aktivitas AChE eritrosit ditentukan secara fotometris dengan metode Ellmann, prinsipnya kinetika enzimatik. Setelah isolasi, pencucian, dan hemolisis eritrosit, kemudian dicampurkan dengan substrat asetilkolin iodida untuk mengetahui aktivitas AChE. Asetilkolin iodida akan diubah menjadi asetat dan thiokolin dengan adanya AChE. Thiokolin iodida yang dihasilkan akan bereaksi dengan reagen Ellman menghasilkan pigmen kuning yang dapat diukur secara fotometrik. Aktivitas enzim secara proporsional merupakan laju pembentukan warna yang diukur sebagai koefisien ekstinsi pada 405 nm selama 4 kali pengukuran setelah penambahan substrat, kemudian koefisien ekstinsi dihitung reratanya. Aktivitas enzim diperoleh dari perbedaan ekstinsi.

Pembuatan Larutan Uji

- a. Siapkan larutan ellmann 0.26 nM dalam dapar fosfat pH 7,2. Simpan dalam botol coklat, suhu dingin, tahan hingga 6 minggu. Timbang NaH_2PO_4 sebanyak 0,62 gram, masukkan ke dalam labu ukur 10 ml, kemudian tambahkan dengan air miliQ hingga mendekati tanda tera. Timbang 5,5-Dithio-bis-2-nitrobenzoic sebanyak 10 mg, masukkan kedalam labu ukur yang sudah ada NaH_2PO_4 , tambahkan dengan air miliQ hingga tanda tera lalu homogenkan.
- b. Siapkan larutan 156 mM asetilkolin iodida dalam miliQ. Simpan dalam suhu dingin, tahan selama 6 minggu. Timbang Acetylthiocholine Iodide Sebanyak 451,12 mg, masukkan ke dalam labu ukur 10 ml, kemudian tambahkan dengan air miliQ hingga tanda tera lalu homogenkan

Untuk Pemeriksaan Asetilkolin

1. Untuk memastikan pemisahan eritrosit dengan plasma tanpa merusak eritrosit, sampel darah harus segera dipisahkan dan dicuci dengan larutan salin.
2. 2 mL larutan salin fisiologis ditambahkan pada 1 mL whole blood, campurkan dengan hati-hati dan sentrifuge pada 1200 g selama 10 menit.
3. Buang bagian atas / larutan saline, sisakan supernatan / endapan dibawah.
4. Lakukan langkah pertama dan kedua sebanyak 3 kali.
5. Supernatan hasil pencucian lalu di tambakah dengan air miliQ sampai tanda batas, kemudian diencerkan dengan 2 ml air miliQ lalu homogenkan.
6. Setelah supernatan ditambah dengan miliQ, encerkan sebanyak 10x pengenceran lalu homogenkan.
7. Larutan dicampur secara manual, setelah 2 menit koefisien ekstinsi diukur pada 405 nm (sebagai koefisien ekstinsi 1). Koefisein ekstinsi 1 tidak boleh melebihi 0,5. Reaksi dijalankan pada suhu $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Lakukan pengukuran berulang setiap 30 detik hingga menit ke 3.30 (ada 4 kali pengukuran), kemudian dihitung reratanya (diambil pada detik ke 30, 60 dan 90; nilai rerata sebagai koefisien ekstinsi 2. Jika perbedaan koefisein ekstinsi terlalu tinggi, $> 0,2$, maka sampel harus diencerkan dengan miliQ.
8. Aktivitas AChE dihitung dengan persamaan Sampling: $-b\text{AChE} = \Delta E.10.23460$

Lampiran 10. Pemeriksaan TCPy Urin

Pemeriksaan dilakukan oleh Prodia Industrial Toxicology Laboratory.

Alat:

- High Performance Liquid Chromatography
- Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry (LC-MS-MS)

Bahan:

- Seluruh bahan yang digunakan dalam metode ini merupakan bahan *analytical grade* untuk HPLC maupun LC-MS-MS
- Standar analit: 3,5,6-Tricholoro-2-pyridinol (No. 33972, *batch* BCBZ8746; Sigma-Aldrich, Swiss)
- Standar internal: 3,5,6-Tricholoro-2-pyridinol-4-5-6-¹³C₃-¹⁵N (No. 756970, lot EB1495; Sigma-Aldrich, Amerika Serikat)
- Hidrogen klorida (Merck, Jerman)
- Sdium klorida (Merck, Jerman)
- Asetonitril (Merck, Jerman)
- Metanol (Tedia, Amerika Serikat)
- Asam format (Kanto, Jepang)

Prosedur ekstraksi dilakukan berdasarkan adaptasi metode dari Smith et.al¹⁰¹, sementara prosedur pemisahan (separasi) dan deteksi menggunakan modifikasi prosedur CDC 6103.03.¹⁰² Pemisahan dilakukan berdasarkan prinsip kromatografi menggunakan Agilent *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC Infinity 1260, Jerman). Akuisisi data dan analisis dilakukan dengan Agilent Ultivo *triple quadrupole mass spectrometer* (Agilent Technologies, Singapore) yang dilengkapi dengan program piranti lunak *Mass-hunter*. Waktu retensi 3.7 menit, akurasi 111,77%, koefisien korelasi 0.9982 dan *recovery* pada 81.05 – 122.47%. Konsentrasi TCPy yang terdeteksi di alat dikoreksi dengan menggunakan kadar kreatinin serum yang diperiksa menggunakan reagen komersial Proline Creatinine PAP FS berbasis metode fotometri sesuai standar pemeriksaan laboratorium.

Lampiran 11. Pemeriksaan PON-1

Pemeriksaan dilakukan oleh Prodia Industrial Toxicology Laboratory.

Penetapan PON-1 di dalam serum secara fotometri.

Alat:

- Spektrofotometri
- *Waterbath*
- Vortex mixer
- Neraca analitik
- Tabung, pipet mikro dan labu ukur

Reagen:

- Tris-(hydroxymethyl)aminomethane
- Calcium chloride (CaCl_2)
- TMAH 25%
- HCl 32%
- Paraoxon-ethyl pestanal
- Nitrofenol
- Air milipore

Prosedur:

A. Pembuatan larutan

Larutan 1

- Ditimbang 121 mg reagen Tris-(hydroxymethyl) aminomethane, masukkan kedalam labu ukur 10mL lalu tambahkan sedikit air milipore
- Ditimbang 3 mg reagen Calcium chloride, masukkan kedalam labu ukur yang berisi larutan Tris-(hydroxymethyl) aminomethane lalu tambahkan air milipore sampai mendekati tanda tera
- Atur pH dengan TMAH 25% atau HCl 32% hingga memperoleh pH 8-8,5
- Tambahkan 2 μL reagen Paraoxon-ethyl pestanal kedalam labu ukur 10 mL diatas, tambahkan air milipore sampai tanda tera lalu homogenkan.

Standar nitrofenol

- Ditimbang 2 mg reagen Nitrophenol, masukkan kedalam labu ukur 5 mL, add dengan air milipore sampai tanda tera lalu homogenkan.

B. Pengukuran

1. Standar Nitrophenol

- a. Pipet 1,5 mL larutan nitrophenol, tambahkan 1,5 mL miliQ lalu homogenkan,
- b. Baca larutan standar Nitrophenol pada panjang gelombang 405nm.

2. Sampel

- a. Pipet 790 μ L larutan 1, masukkan kedalam tabung reaksi, tambahkan 10 μ L sampel, lalu homogenkan
- b. Inkubasi pada suhu 37°C dalam *waterbath* selama 3 menit
- c. Baca sampel pada panjang gelombang 405 nm

Lampiran 12. Lembar Pemeriksaan Fisik

LEMBAR PEMERIKSAAN FISIK

Identitas

Nama

Tanggal lahir

Jenis Kelamin

Telepon

Alamat

Keadaan Umum	
Tinggi badan (M)	
Berat badan (Kg)	
Lingkar pinggang (cm)	
Indeks Massa Tubuh (Kg/M ²)	
Tanda Vital	
Nadi	
Tekanan darah	
Pernafasan	
Pemeriksaan Khusus	
Rambut kering / rontok	
Exophthalmus	
Kelenjar tiroid	
Kulit kering	
Akral dingin	
Tremor	
Lain-lain	

Lampiran 13. Lembar Kuesioner Penelitian

FORM KUESIONER PENELITIAN

IDENTITAS

- No. Register _____
- Nama _____
- Jenis Kelamin Wanita
- Tanggal Lahir _____ (hari/bulan/tahun)
- Umur _____ tahun
- Pendidikan terakhir SD - SMP
- Status pernikahan Tidak Menikah
- Jumlah anak _____ anak
- Pekerjaan utama _____
- Pekerjaan sampingan _____
- Pengalaman usaha tani _____

DATA PEKERJAAN

- Berapa kali dalam setahun anda menanam bawang putih?
- Pada bulan apa anda menanam bawang putih?
- Dalam 12 bulan terakhir jenis tanaman apa saja yang anda tanam di lahan
- Lama kerja sebagai petani _____ tahun _____ bulan
- Durasi kerja harian _____ jam _____ ha
- Luas lahan _____
- Status kepemilikan lahan Milik sendiri
- Merk pestisida klorpirifos yang digunakan Bukan milik sendiri
- Sediaan Bubuk Cairan
- Cara penggunaan Penaburan Pengasapan
- Dosis pestisida yang digunakan Tidak sesuai petunjuk Lainnya _____
- Waktu penyemprotan Pagi hari (s.d 10) Siang hari (10 - 14) Sore hari (> 14)
- Apakah anda sendiri yang menyiapkan pestisida yang akan digunakan? Kadang-kadang Tidak pernah
- Apakah anda sendiri yang menuang pestisida yang akan digunakan? Kadang-kadang Tidak pernah
- Apakah anda mencampur lebih dari 1 jenis pestisida dalam sekali penggunaan? Kadang-kadang Tidak pernah
- Berapa jenis pestisida yang anda campur? Kadang-kadang Lebih dari 3 jenis
- Frekuensi pajanan (menyiapkan/ menuang/ mencampur/ menyemprot) _____ x/minggu
- Durasi pajanan (menyiapkan/ menuang/ mencampur/ menyemprot) _____ jam / minggu
- Alat penyemprot _____
- Posisi menyemprot Searah angin Berlawanan arah angin

Apakah anda selama bekerja menggunakan alat pelindung diri di bawah ini:

- Apron Kadang-kadang Tidak pernah
- Masker Kadang-kadang Tidak pernah
- Penutup wajah Kadang-kadang Tidak pernah
- Respirator Kadang-kadang Tidak pernah
- Goggles (Kaca mata) Kadang-kadang Tidak pernah
- Pakain lengan panjang Kadang-kadang Tidak pernah

- Celana panjang Selalu Sering Kadang-kadang Tidak pernah
 - Cover-all Selalu Sering Kadang-kadang Tidak pernah
 - Sarung tangan kimia Selalu Sering Kadang-kadang Tidak pernah
 - Sepatu bot Selalu Sering Kadang-kadang Tidak pernah
 - Apakah anda selama bekerja melakukan perilaku di bawah ini:
 - Mengelap keringat dengan pakaian kerja Selalu Sering Kadang-kadang Tidak pernah
 - Memasuki kembali area yang baru disemprot Selalu Sering Kadang-kadang Tidak pernah
 - Menyemprot berlawanan arah angin Selalu Sering Kadang-kadang Tidak pernah
 - Menggunakan ransel penyemprot yang rusak Selalu Sering Kadang-kadang Tidak pernah
 - Terkena percikan atau tumpahan cairan pestisida saat menyemprot Selalu Sering Kadang-kadang Tidak pernah
 - Terkena percikan atau tumpahan saat memuang pestisida Selalu Sering Kadang-kadang Tidak pernah
 - Makan ditengah waktu bekerja Selalu Sering Kadang-kadang Tidak pernah
 - Menyetuh langsung cairan pestisida Selalu Sering Kadang-kadang Tidak pernah
 - Mencuci tangan setelah mengaplikasikan pestisida Selalu Sering Kadang-kadang Tidak pernah
 - Mencuci tangan sebelum makan Selalu Sering Kadang-kadang Tidak pernah
 - Mandi setelah mengaplikasikan pestisida Selalu Sering Kadang-kadang Tidak pernah
 - Mengganti pakaian setelah mengaplikasikan pestisida Selalu Sering Kadang-kadang Tidak pernah
- KEBIASAAN MEROKOK**
- Apakah anda merokok? Ya Tidak Pernah merokok Tidak menjawab
 - Bila Ya,
 - Sejak usia berapa anda mulai merokok? _____ tahun
 - Berapa batang rokok yang anda hisap per hari? _____ batang Lupa
- KEBIASAAN MINUM ALKOHOL**
- Apakah anda biasa mengkonsumsi alkohol? Ya Tidak Pernah minum alkohol Tidak menjawab
 - Bila Ya,
 - Berapa gelas alkohol yang anda konsumsi setiap hari? ≤ 1 gelas 1 botol > 1 botol
 - Sejak kapan anda mulai minum alkohol? _____ tahun Lupa
- KEBIASAAN MINUM KOPI**
- Apakah anda biasa mengkonsumsi kopi? Ya Tidak Tidak menjawab
 - Bila Ya,
 - Berapa gelas kopi yang anda konsumsi setiap hari? 1 gelas 2-3 gelas > 3 gelas
 - Sejak kapan anda mulai minum kopi? _____ tahun Lupa
- KEBIASAAN OLAAHRAGA**
- Apakah anda berolahraga secara teratur? Ya Tidak Tidak menjawab
 - Bila Ya,
 - Olah raga apa yang rutin anda lakukan? _____
 - Berapa kali dalam seminggu anda berolahraga? _____ x/minggu
- KONSUMSI OBAT**
- Apakah saat ini anda sedang mengkonsumsi obat yang diresepkan Dokter? Ya, _____ Tidak
 - Apakah saat ini anda sedang mengkonsumsi obat / vitamin / jamu? Ya, _____ Tidak

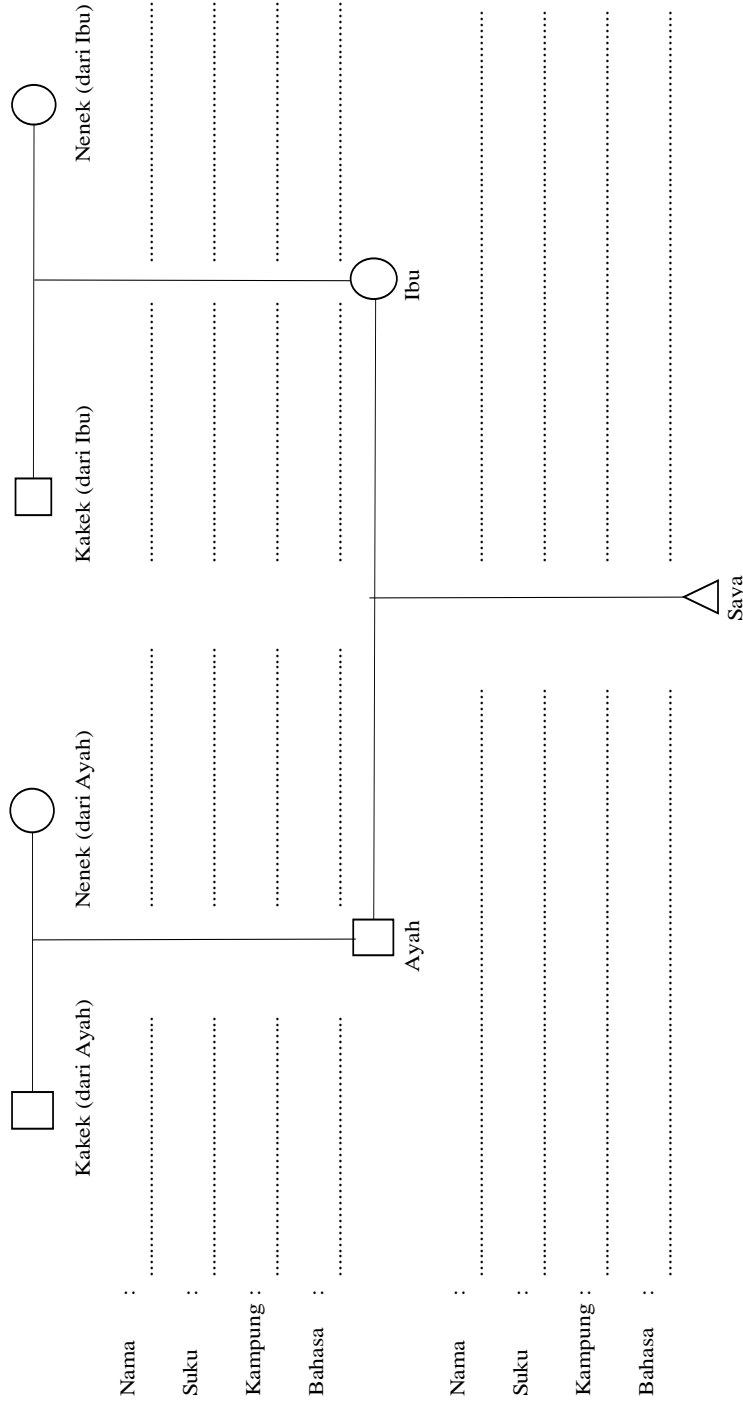
Lampiran 14. Skor Perhitungan Dosis Paparan Harian Berdasarkan *Agricultural Health Study*
LEMBAR PENILAIAN DOSIS PAJANAN

KODE	RINCIAN AKTIVITAS	SKOR	SKOR SUBJEK
MIX	Kegiatan mencampur pestisida (<i>mix</i>)		
	- Tidak pernah	0	
	- Mencampur pestisida	9	
ENCLOS ED	Metode dalam mencampur pestisida (<i>enclosed</i>)		
	- Tertutup	0,5	
	- Terbuka	1	
APPL	Metode pengaplikasian pestisida (<i>appl</i>)		
	- Tidak mengaplikasikan pestisida	0	
	- Pesawat terbang	1	
	- Aplikasi langsung di antara alur tanaman	2	
	- <i>Boom</i> menggunakan traktor	3	
	- Ransel	8	
	- Semprotan tangan	9	
	- <i>Fogger / mist blower</i>	9	
	- Ledakan di udara	9	
CAB	Penggunaan kendaraan tertutup (<i>cab</i>)		
	* Hanya untuk <i>Appl : boom, in-furrow</i> , semprotan tangan, <i>mist blower</i> atau ledakan di udara menggunakan traktor		
	- Menggunakan traktor tertutup + filter charcoal	0,1	
	- Menggunakan traktor tertutup namun tanpa filter charcoal	0,5	
	- Tidak menggunakan traktor	1	
REPAIR	Melakukan perbaikan peralatan penyemprotan (<i>repair</i>)		
	- Tidak melakukan perbaikan alat	0	
	- Melakukan perbaikan alat	2	
WASH	Melakukan pencucian peralatan penyemprotan (<i>wash</i>)		
	- Tidak mencuci	0	
	- Membersihkan selang penyemprot	0,5	
	- Membersihkan mulut pipa semprot (<i>nozzle</i>)	3	
	- Membilas tangki	1	

	Penggunaan alat pelindung diri (APD)		
	- Tidak pernah menggunakan APD / hanya menggunakan helm (0% perlindungan)		1
	- Kategori 1 (20% perlindungan): masker debu / goggles / penutup wajah / apron / cover all / sarung tangan kulit atau kain		0,8
	- Kategori 2 (30% perlindungan): respirator + cartridge / masker gas / sepatu boot khusus pajanan kimia / pakaian kerja sekali pakai		0,7
PPE	- Kategori 3 (40% perlindungan): sarung tangan berbahan karet khusus pajanan kimia		0,6
	- Kombinasi kategori 1 + 2		0,5
	- Kombinasi kategori 1 + 3		0,4
	- Kombinasi kategori 2 + 3		0,3
	- Kombinasi kategori 1 + 2 + 3		0,1
	Penggantian sarung tangan kulit / kain (<i>repl</i>)		
REPL	- Setiap kali digunakan		1
	- 1x per bulan atau 1 - 4 kali per musim		1,1
	- Saat sarung tangan rusak		1,2
	Higiene individu (<i>hyg</i>)		
HYG	- Kategori 1 (80% perlindungan)		0,2
	*Segera mengganti pakaian / menggunakan pakaian kerja sekali pakai dan mencuci tangan / mandi segera atau saat istirahat siang		
	- Kategori 2 (60% perlindungan)		0,4
	*Segera mengganti pakaian / menggunakan pakaian kerja sekali pakai dan mandi di akhir hari kerja		
	*Mengganti pakaian saat istirahat siang/ akhir hari kerja dan mencuci tangan / mandi segera atau saat istirahat siang		0,6
	- Kategori 3 (40% perlindungan)		
	*Segera mengganti pakaian / menggunakan pakaian kerja sekali pakai dan mencuci tangan hanya di akhir hari kerja		
	*Mengganti pakaian saat istirahat siang/ akhir hari kerja dan mandi di akhir hari kerja		
	*Mengganti pakaian keesokan hari / pada akhir minggu kerja dan mencuci tangan / mandi segera atau saat istirahat siang		0,8
	- Kategori 4 (20% perlindungan)		
*Mengganti pakaian saat istirahat siang/ akhir hari kerja dan mencuci tangan / mandi di akhir hari kerja			
*Mengganti pakaian keesokan hari / pada akhir minggu kerja dan mandi di akhir hari kerja			
- Kategori 5 (0% perlindungan)		1	
*Mengganti pakaian keesokan hari / pada akhir minggu kerja dan mencuci tangan hanya di akhir hari kerja			
	Penanganan tumpahan / percikan pestisida (<i>spill</i>) dengan mengganti pakaian setelah terkena tumpahan / percikan		
SPILL	- Pada saat terkena percikan / tumpahan		1
	- Menggunakan pakaian kerja sekali pakai		1
	- Saat makan siang		1,1
	- Pada akhir hari kerja		1,2
	- Pada akhir hari kerja keesokan hari		1,4
	- Pada akhir minggu		1,8

Lampiran 15. Lembar Silsilah Keluarga

SILSILAH KELUARGA



Nama :
 Suku :
 Kampung :
 Bahasa :

Nama :
 Suku :
 Kampung :
 Bahasa :

Nama :
 Suku :
 Kampung :
 Bahasa :

Lampiran 16. Kartu Kontrol Pemeriksaan Subjek**KARTU KONTROL****Nama:****Lab ID:**

No	Aktifitas Penelitian	Tanggal	Paraf peserta	Paraf petugas
1	Informed Consent			
2	Pengisian identitas			
3	Pengisian kuesioner			
4	Pemeriksaan fisik			
5	Sampel urin			
6	Sampel darah			

KARTU KONTROL**Nama:****Lab ID:**

No	Aktifitas Penelitian	Tanggal	Paraf peserta	Paraf petugas
1	Informed Consent			
2	Pengisian identitas			
3	Pengisian kuesioner			
4	Pemeriksaan fisik			
5	Sampel urin			
6	Sampel darah			

Lampiran 17. Surat Keterangan Lolos Kaji Etik



UNIVERSITAS INDONESIA

FAKULTAS KEDOKTERAN

Gedung Fakultas Kedokteran UI
 Jl. Salemba Raya No.6, Jakarta 10430
 P.O.Box 1358
 T. 62.21.3912477, 31930371, 31930373,
 3922977, 3927360, 3153236
 F. 62.21.3912477, 31930372, 3157288
 E. humas@fk.ui.ac.id, office@fk.ui.ac.id
 fk.ui.ac.id

Nomor : KET- 339 /UN2.F1/ETIK/PPM.00.02/2020

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK ETHICAL APPROVAL

Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subjek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol penelitian yang berjudul:

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, University of Indonesia, with regards of the Protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the research entitled:

"Biomonitoring pada Penyemprot Pestisida dengan Paparan Utama Klorpirifos: Analisis Interaksi Dosis Paparan Kumulatif, PONI, Variasi Genetik CYP2B6 dan CYP2C19 terhadap Kejadian Hipotiroid"

Protocol Number : 20-03-0336

Peneliti Utama : dr. Liem Jen Fuk, Sp.Ok., MKK
Principal Investigator

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
Name of the Institution

Lokasi Penelitian : 1. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
Site : 2. Sentra Pertanian Tawang Mangu, Jawa Tengah
 3. Laboratorium Prodia, Toksikologi Industri Prodia OHI

Tanggal Persetujuan : 23 MAR 2020
Date of Approval (valid for one year beginning from the date of approval)

Dokumen Disetujui : Proposal Penelitian, Versi 00 tanggal 20 Februari 2020
Document Approved Lembar Informasi untuk Calon Subjek, Versi 00 tanggal 20 Februari 2020

dan telah menyetujui protokol berikut dokumen terlampir.
 and approves the above mentioned protocol including the attached document.

Ditctapkan di : Jakarta
 Specified in

Wakil Ketua

 dr. Nia Kurniati, M.Sc., Sp.A(K)

**** Peneliti berkewajiban**

1. Menjaga kerahasiaan identitas subjek penelitian.
2. Membentahukan status penelitian apabila:
 - a. Setelah masa berlakunya keterangan lolos kaji etik, penelitian masih belum selesai, dalam hal ini *ethical approval* harus diperpanjang.
 - b. Penelitian berhenti ditengah jalan.
3. Melaporkan kejadian serius yang tidak diinginkan (*serious adverse events*).
4. Peneliti tidak boleh melakukan tindakan apapun pada subjek sebelum protokol penelitian mendapat lolos kaji etik dan sebelum memperoleh *informed consent* dari subjek penelitian.
5. Menyampaikan laporan akhir, bila penelitian sudah selesai.
6. Cantumkan nomor protokol ID pada setiap komunikasi dengan KEPK FKUI-RSCM.

Semua prosedur persetujuan dilakukan sesuai dengan standar ICH-GCP.
 All procedure of Ethical Approval are performed in accordance with ICH-GCP standard procedure.

Lampiran 18. Amandemen Surat Keterangan Lolos Kaji Etik



UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN

Gedung Fakultas Kedokteran UI
Jl. Salemba Raya No.6, Jakarta 10430
PO.Box 1950
T. 62.21.3912477, 31930371, 31930373,
3922977, 3927360, 3153236,
F 62 21 3912477 31930372, 3157288,
E. humas@fk.ui.ac.id, office@fk.ui.ac.id
fk.ui.ac.id

NOTA DINAS

Nomor: ND- 097 /UN2.F1/ETIK/PPM.00.02/2020

Kepada : dr. Liem Jen Fuk, Sp.Ok., MKK
Institusi : Peneliti Utama Program Studi Ilmu Kedokteran FKUI
Dari : Komite Etik Penelitian Kesehatan FKUI-RSCM
Hal : Amandemen Protokol Penelitian

Sehubungan dengan protokol penelitian berikut:

Judul : "Biomonitoring pada Penyemprot Pesticida dengan Paparan Utama Klorpirifos:
Analisis Interaksi Dosis Paparan Kumulatif, PON1, Variasi Genetik CYP2B6 dan
CYP2C19 terhadap Kejadian Hipotiroid."

Peneliti Utama : dr. Liem Jen Fuk, Sp.Ok., MKK
No. Protokol Etik : 20-03-0336
No. Surat Lolos Etik : KET-339/UN2.F1/ETIK/PPM.00.02/2020, tanggal 23 Maret 2020.

Komite Etik Penelitian Kesehatan RSCM telah menerima dan meninjau surat Sejawat:

Tanggal	No. Surat	Perihal	Dokumen
27 Agustus 2020	-	Permohonan Amandemen <i>Ethical Approval</i>	1. Proposal Penelitian, 1 kopi 2. Salinan surat keterangan lolos kaji etik, 1 kopi
Isi Amandemen :			
No.	Bab/Hal	Versi 00 (20 Februari 2020)	Versi 01 (27 Agustus 2020)
1.	3.2 Tempat dan waktu penelitian (Hal.35)	Tawangmangu, Kab. Karanganyar	Tawangmangu, Kab. Karanganyar dan Kaliangkrik, Kab. Magelang
2.	3.3.1 Populasi Penelitian (Hal. 35)	Populasi terjangkau: petani Penyemprot pestisida klorpirifos berusia 18-65 tahun di sentra pertanian bawang putih di Tawangmangu Jawa Tengah	Populasi terjangkau: petani penyemprot pestisida klorpirifos berusia 18-65 tahun di sentra pertanian bawang putih dan sayuran di Tawangmangu dan Kaliangkrik, Jawa Tengah

Komite Etik Penelitian Kesehatan FKUI-RSCM menyetujui amandemen pada protokol penelitian tersebut.

Atas laporan dan kerjasamanya, kami ucapkan terima kasih.

31 Agustus 2020
Ketua KEPK FKUI-RSCM

Prof. dr. Rita Sita Sitorus, PhD, SpM(K)

Semua prosedur persetujuan dilakukan sesuai dengan standar ICH-GCP.
All procedures of Ethical Approval are performed in accordance with ICH-GCP standard procedure.

Lampiran 19. Izin Pengambilan Data Penelitian dari Kabupaten Karanganyar



PEMERINTAH KABUPATEN KARANGANYAR DINAS KESEHATAN

Alamat : Jl. Lawu Nomor 168 Karanganyar Telp. (0271) 495059 Fax. 495102
Website : dinkes.karanganyarkab.go.id, e-mail : dinkes@karanganyarkab.go.id

Nomor : 005 / 1784.4.5 / V / 2020
Lampiran : -
Perihal : **Permohonan Izin
Pengambilan data**

Kepada Yth:
dr. Liem Jen Fuk, Sp.Ok, MKK

Di - JAKARTA

Menindaklanjuti surat peserta program Doktor Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia yang akan melaksanakan penelitian di wilayah Kabupaten Karanganyar.

Nama : dr. LIEM JEN FUK, Sp.OK, MKK

NPM : 1806274096

JUDUL : Biomonitoring pada Penyemprotan Pestisida dengan Paparan Utama Klorpirifos: Analisis Interaksi Dosis Paparan Kumulatif, PONI, Variasi Genetik CYP2B6 dan CYP2C19 terhadap Kejadian Hipotiroid.

Waktu : Juni – Agustus 2020

Sehubungan Permohonan Izin tersebut kami tidak keberatan memberikan izin untuk melakukan pengambilan data penelitian di Kabupaten Karanganyar.

Demikian Surat izin ini untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.



Karanganyar, 29 Mei 2020

Plt. Kepala Dinas Kesehatan
Kabupaten Karanganyar



Purwati, S4KM, M.Kes.
NIP. 19730723 1996303 2 005

Lampiran 20. Izin Kegiatan Penelitian dari Kabupaten Magelang

	DINAS PENANAMAN MODAL DAN PELAYANAN TERPADU SATU PINTU Jl. Soekarno Hatta No. 20 Telp. f 0293 j 788249 Faks 789549 Kota Mungkid 56511 Website : http://dpmptsp.magelangkab.go.id																		
Kota Mungkid, 01 September 2020																			
Nomor : 070/285/16/2020	Kepada :																		
Sifat : Biasa	Yth. LIEM JEN FUK																		
Perihal : Izin Penelitian	Jl. Raya Hankam Pondok Artha No 62 RT.03 RW.05 Kel. Jatimurni Kec. Pondok Melati Kota Bekasi Jabar di BEKASI																		
<p>Dasar : Surat Kepala Kantor Kesatuan Bangsa dan Politik Kabupaten Magelang Nomor : 070/472/47/2020 Tanggal 01 September 2020, Perihal Rekomendasi.</p> <p>Dengan ini kami tidak keberatan dan menyetujui atas pelaksanaan Kegiatan Riset/ Penelitian/ PKL di Kabupaten Magelang yang dilaksanakan oleh saudara :</p> <table border="0"> <tr> <td>Nama</td> <td>: LIEM JEN FUK</td> </tr> <tr> <td>Pelerajaan</td> <td>: Mahasiswa, Universitas Indonesia</td> </tr> <tr> <td>Alamat</td> <td>: Jl. Raya Hankam Pondok Artha No 62 RT.03 RW.05 Kel. Jatimurni Kec. Pondok Melati Kota Bekasi Jabar</td> </tr> <tr> <td>Nomor HP</td> <td>: 081905953919</td> </tr> <tr> <td>Penanggung jawab</td> <td>: Prof. Dr. Dr. Suhendro, SpPd-KPTI</td> </tr> <tr> <td>Lokasi</td> <td>: Desa Adipuro Kecamatan Kaliangkrak Kabupaten Magelang</td> </tr> <tr> <td>Waktu</td> <td>: 01 September 2020 s/d 01 Desember 2020</td> </tr> <tr> <td>Peserta</td> <td>: -</td> </tr> <tr> <td>Mengadakan Penelitian dengan judul</td> <td>: BIOMONITORING PADA PENYEMPROT PESTISIDA DENGAN PAJANAN UTAMA KLORPIRIFOS : ANALISIS INTERAKSI DOSIS PAJANAN KUMULATIF, PONI, VARIASI GENETIK CYP2B6 DAN CYP2C19 TERHADAP KEJADIAN HIPOTIROID</td> </tr> </table> <p>Sebelum Melaksanakan Kegiatan Penelitian/PKL agar Saudara Mengikuti Ketentuan - ketentuan sebagai berikut :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Melaporkan kepada Pejabat Pemerintahan setempat untuk mendapat petunjuk seperlunya. 2. Wajib menjaga tata tertib dan mentaati ketentuan - ketentuan yang berlaku 3. Setelah pelaksanaan kegiatan selesai agar menyampaikan laporan hasilnya kepada Kepala Dinas Penanaman Modal dan Pelayanan Terpadu Satu Pintu, Kepala Bappeda dan Litbangda dan Kepala Kantor Kesbangpol Kabupaten Magelang. 4. Surat Izin dapat dicabut dan dinyatakan tidak berlaku, apabila pemegang surat ini tidak mentaati / mengindahkan peraturan yang berlaku. <p style="text-align: center;">Demikian untuk menjadikan periksa dan guna seperlunya</p> <div style="text-align: right;"> <p>a.n KEPALA DINAS PENANAMAN MODAL DAN PELAYANAN TERPADU SATU PINTU KABUPATEN MAGELANG Ub Kepala Bidang Pelayanan Perizinan</p>  <p>ENI RETNAWATI, S.Sos Penata Tingkat I NIR 196701191986072001</p> </div> <p>Tembusan :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Bupati Magelang 2. Kepala Badan/ Dinas Kantor/Instansi terkait 		Nama	: LIEM JEN FUK	Pelerajaan	: Mahasiswa, Universitas Indonesia	Alamat	: Jl. Raya Hankam Pondok Artha No 62 RT.03 RW.05 Kel. Jatimurni Kec. Pondok Melati Kota Bekasi Jabar	Nomor HP	: 081905953919	Penanggung jawab	: Prof. Dr. Dr. Suhendro, SpPd-KPTI	Lokasi	: Desa Adipuro Kecamatan Kaliangkrak Kabupaten Magelang	Waktu	: 01 September 2020 s/d 01 Desember 2020	Peserta	: -	Mengadakan Penelitian dengan judul	: BIOMONITORING PADA PENYEMPROT PESTISIDA DENGAN PAJANAN UTAMA KLORPIRIFOS : ANALISIS INTERAKSI DOSIS PAJANAN KUMULATIF, PONI, VARIASI GENETIK CYP2B6 DAN CYP2C19 TERHADAP KEJADIAN HIPOTIROID
Nama	: LIEM JEN FUK																		
Pelerajaan	: Mahasiswa, Universitas Indonesia																		
Alamat	: Jl. Raya Hankam Pondok Artha No 62 RT.03 RW.05 Kel. Jatimurni Kec. Pondok Melati Kota Bekasi Jabar																		
Nomor HP	: 081905953919																		
Penanggung jawab	: Prof. Dr. Dr. Suhendro, SpPd-KPTI																		
Lokasi	: Desa Adipuro Kecamatan Kaliangkrak Kabupaten Magelang																		
Waktu	: 01 September 2020 s/d 01 Desember 2020																		
Peserta	: -																		
Mengadakan Penelitian dengan judul	: BIOMONITORING PADA PENYEMPROT PESTISIDA DENGAN PAJANAN UTAMA KLORPIRIFOS : ANALISIS INTERAKSI DOSIS PAJANAN KUMULATIF, PONI, VARIASI GENETIK CYP2B6 DAN CYP2C19 TERHADAP KEJADIAN HIPOTIROID																		

Lampiran 21. Publikasi

Liem et al. *BMC Public Health* (2021) 21:1066
<https://doi.org/10.1186/s12889-021-11161-5>

BMC Public Health

RESEARCH

Open Access

Cumulative exposure characteristics of vegetable farmers exposed to Chlorpyrifos in Central Java – Indonesia; a cross-sectional study



Jen Fuk Liem^{1,2*}, Muchtaruddin Mansyur³, Dewi S. Soemarmo³, Aria Kekalih³, Imam Subekti⁴, Franciscus D. Suyatna⁵, Dwi A. Suryandari⁶, Safarina G. Malik⁷ and Bertha Pangaribuan⁸

Abstract

Background: Agriculture is a major economic sector in Indonesia. Chemical pesticides are widely being used in agriculture for controlling pest. There is a growing concern that pesticide exposure, particularly chlorpyrifos (CPF) exposure, combined with other occupational characteristics that determine the level of exposure, can lead to further health impacts for farmers. Our objective was to evaluate the cumulative exposure characteristics among farmers exposed to CPF by using a validated algorithm.

Methods: We conducted a cross-sectional study of 152 vegetable farmers aged 18–65 who actively used CPF for at least 1 year in Central Java, Indonesia. Subject characteristics were obtained using a structured interviewer-administered questionnaire, addressed for sociodemographic and work-related characteristics. The cumulative exposure level (CEL) was estimated as a function of the intensity level of pesticide exposure (IL), lifetime years of pesticide use and the number of days spraying per year. CEL was subsequently classified into two groups, high and low exposure groups. The difference in characteristics of the study population was measured using Chi-square, independent-t or Mann-Whitney test. Association between CEL and its characteristics variables were performed by multiple linear regression.

Results: Seventy-one subjects (46.7%) were classified as the high exposure group. The use of multiple pesticide mixtures was common among our study population, with 94% of them using 2 or more pesticides. 73% reported direct contact with concentrated pesticides product, and over 80% reported being splashed or spilled during preparation or spraying activity. However, we found that the proportion of proper personal protective equipment (PPE) use in our subjects was low. Higher volume of mixture applied ($p < 0.001$) and broader acres of land ($p = 0.001$) were associated with higher cumulative exposure level, while using long-sleeved clothes and long pants ($p < 0.05$) during pesticide spraying were associated with lower cumulative exposure after adjusted for age and gender.

* Correspondence: jenfuk.d@gmail.com

¹ Doctoral Program, Faculty of Medicine Universitas Indonesia, Jakarta 10430, Indonesia

² Department of Occupational Health and Safety, Faculty of Medicine and Health Science Universitas Kristen Krida Widiana, Jakarta 11510, Indonesia
 Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2021 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Conclusions: These findings indicate an inadequate knowledge of using pesticides properly. Thus, we recommend comprehensive training on pesticide usage and encourage proper PPE to reduce the exposure level.

Keywords: Pesticide cumulative exposure, Exposure assessment, Exposure reduction, Work practices, Occupational characteristics

Background

Agriculture is a major economic sector in Indonesia. Chemical pesticides are widely being used in agriculture for the control of the pest. Organophosphate (OP) is one of the most widely used pesticides today for that purpose. In 2015, more than half of the pesticides used worldwide were organophosphate (OP) insecticides, with 40% of which were chlorpyrifos (CPF) [1]. The similar situation occurs in Indonesia in the context of the widespread use of pesticides in the agricultural sector [2]. In Indonesia, the number of registered pesticide products has increased from 2605 in 2010 to 3207 in 2016.

Workers in the agricultural sector, especially pesticides applicators, will be exposed to certain amounts of OP and develop certain risks of health problems associated with OP exposure. Generally, exposure to CPF and other pesticides occurs through skin contact, inhalation, or ingestion. Occupational pesticide exposure in the agricultural sector was obtained from several activities, including preparing, mixing, loading, spraying pesticide, and cleaning used equipment. Farmers can also be exposed through re-entering the sprayed area, manipulating crops or harvesting the crops that may still be contaminated with pesticides [3]. Unfortunately, the exposure conditions described above are also accompanied by limited awareness about health problems caused by exposure to pesticides, knowledge of safe work practices, and proper personal protective equipment (PPE) among the farmers [2, 4]. Therefore, there is a growing concern that inappropriate and unsafe use of pesticides may lead to farmers' health problems [5, 6]. In particular, CPF exposed farmers are vulnerable to several deleterious effects, including neurological symptoms, reproductive hormone alteration, metabolic disruption, and endocrine disruption [7–10].

Several factors such as the type of pesticide, the concentration of the pesticide, the length of exposure, the path of exposure and the proper use of PPE are important factors that determine the severity of the exposure [11–13]. The large-scale experiment in an ideal setting to directly assess the dose-response relationship of pesticides exposure to associated health problems have particular difficulties [12]. Assuming that particular pesticides exposure will lead to specific health problem. In that case, we could expect a linear dose-response relationship between external dose (i.e. occupational and or environmental exposure) and internal dose (i.e.

concentration of a chemical or its toxic metabolite in the human body) [13]. This explains that the higher the external dose will result in an increased risk of developing health problems as indicated by the finding of a higher internal dose. However, accurate exposure assessment in epidemiological studies is still difficult to obtain, and real values of exposure to pesticides are not easy to predict [3], especially when resources for assessing direct exposure are limited and studies are conducted in the informal (small-scale) agricultural sector. Therefore, indirect estimation of exposure dose from the worker's specific task to obtain closer to the actual condition may bridge this gap.

This study's objective was to evaluate the cumulative exposure characteristics among Javanese vegetable farmers exposed to chlorpyrifos in Indonesia using a validated algorithm. We hope our results will provide supporting data that can be applied to reduce the exposure level for farmers.

Methods

Study area and population

We conducted a cross-sectional study of 152 vegetable farmers from 2 villages, Pancot village, Tawangmangu District, and Adipuro village, Kaliangkrik District, which are known as the largest garlic production areas in Central Java, Indonesia from July to October 2020. The agricultural practices and sociodemographic characteristics of farmers in these two villages are very similar to other garlic plantations in Indonesia. There were 92 farmers in Pancot Village and 103 farmers in Adipuro village as the sample frame of the study. From the sample frame, 23 subjects were excluded due to incomplete examination process and 20 other subjects withdrew from the study. The minimum sample size required for this study was 97 subjects, calculated using a single sample formula to estimate proportions with a 95% confidence interval, 10% precision error and 50% estimated CEL proportion. We decided to take the total sample consecutively from the sample frame so that 78 farmers in Pancot village and 74 farmers in Adipuro village who met the criteria and gave written consent to participate in the study were selected as the study subjects. We introduced the study's objective, goals, and data confidentiality during the recruitment process. Participant enrolment criteria were vegetable farmers aged 18–65 who actively use CPF for at least 1 year.

The study subjects then completed a structured interviewer-administered questionnaire and underwent the anthropometric measurement. Subject characteristics were obtained using a structured interviewer-administered questionnaire addressed for sociodemographic and occupational characteristics. Sociodemographic characteristics consist of several questions such as age, gender, smoking habit and educational background. The interview for agricultural work-related (occupational) characteristics consisted of several specific questions on those related to pesticides exposure, work practice, and the use of personal protective equipment (PPE). We randomly asked several important questions to determine the answer's consistency to limit the possibility of misclassification of exposure. We also provided short education to raise awareness about pesticide use and safety precautions to the participants at the end of the sessions.

All methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations. The study protocol was approved by the Ethical Committee of the Faculty of Medicine Universitas Indonesia on March 23, 2020 (No. KET-339/UN2.F1/ETIK/PPM.00.02/2020).

Cumulative exposure level

The intensity level of pesticide exposure was calculated using the validated method from Dosemeci [14]. The overall exposure intensity level is then combined with information on lifetime years of pesticide use and the number of days spraying per year to produce the cumulative exposure level as shown in the following algorithm:

$$IL = (\text{Mix} + \text{Appl} + \text{Repair} + \text{Wash}) \times \text{PPE} \times \text{Repl} \times \text{Hyg} \times \text{Spill}$$

IL = Intensity Level of pesticide exposure

Mix = Pesticide mixing activity

Appl = Application methods

Repair = Repairing equipment

Wash = Washing equipment after spraying

PPE = Personal Protective Equipment utilisation

Repl = Replacing old gloves

Hyg = Personal hygiene practices

Spill = Spill treatment (changing clothes after a spill)

There are several similar conditions among study participants in terms of exposure during crop insecticides application. The activities of preparing, mixing, loading, and spraying pesticide using a knapsack sprayer are carried out personally by each study participant in the open area. The status of mixing activity was given a score of 9 for self-preparation and mixing the pesticides; and a score 9 for applying pesticides using a knapsack sprayer. Washing pesticide equipment after spraying was defined as "do not wash" (score = 0) and "rinse tank" (score = 1).

The status of personally repaired spraying equipment was defined as "no repair" (score = 0) and "repair" (score = 2). For the status of replacing old gloves, all participants were given a score of 1.2 for not wearing gloves or using damaged gloves.

The use of PPE use was categorized into the following levels:

Score 1: Not using PPE

Score 0.8: PPE-1 (dust mask / goggles / apron)

Score 0.7: PPE 2 (cartridge respirator / boots)

Score 0.6: PPE 3 (chemical gloves)

Score 0.5: Combination of PPE 1 & 2

Score 0.4: Combination of PPE 1 & 3

Score 0.3: Combination of PPE 2 & 3

Score 0.1: Combination of PPE 1, 2 & 3 (proper PPE use)

Personal hygiene habits were scored as follows:

Score 0.2: Change clothing + handwash/ shower immediately after exposure

Score 0.4: Change clothing + handwash/ shower at lunch (breaktime)

Score 0.6: Change clothing + handwash/ shower at lunch (breaktime) or at the end of the day

Score 0.8: Change clothing + handwash/ shower at the end of the day

Spill treatment (changing clothes after spill) was categorized into 4 levels: changing clothes right away after spill, at lunch, at the end of the day, and at the end of the next day; the scores were 1.0, 1.1, 1.2, and 1.4, respectively.

$$CEL = IL \times \text{Duration} \times \text{Frequency}$$

CEL = Cumulative Exposure Level

IL = Intensity Level of pesticide exposure

Duration = Lifetime years of pesticide use

Frequency = Number of days spraying per year

Because the CEL was not normally distributed, it was classified into two groups, high and low exposure groups, with the median as the cut-off point.

Agricultural work-related characteristics

There are several agricultural work-related (occupational) characteristics that were not used in the CEL calculation including:

Arable land area = total arable land area in acres

Number of arable lands

Daily work duration (hours) = average duration of all agricultural activities on the farm in hours/day

Duration of spraying pesticide = average duration of spraying activity in hours/day

Volume of the mixture applied = average volume of the mixture applied in litre/day

We also categorized the type of knapsack sprayer used as manually pressurised sprayer or motorised sprayer; spraying time as spraying in the morning time or in other time; and the mixture of pesticide as using more than 3 pesticide in mixture or using 1–3 pesticides in mixture.

Statistical analysis

All analysis was performed using SPSS 20 for Windows.

The study population characteristics were summarised with frequency distribution and percentages for categorical variables, while continuous variables were described using mean \pm SD or median (minimum-maximum). Chi-square test, independent t-test or Mann-Whitney test were used to measure the difference in the characteristics of the study population according to the cumulative exposure level group. All *p* values are two-sided, with significance was considered at *p* < 0.05 for these tests.

Association between CEL and its characteristic variables were performed by multilinear regression analysis. Variables associated with CEL at a significance level of *p* \leq 0.20 in the simple regression analysis were included in the multivariate model. The variables were retained in the final model when they were associated with CEL at a significance level of 0.05 according to the stepwise procedure.

Results

Our study population was 152 farmers with the mean age of 49.91 \pm 9.42 years, consisting of 90.1% male, 92.8% as members of farmers' society, and 86.8% in low educational level. The median (minimum-maximum) IL score, lifetime years of pesticide use, number of days spraying per year and CEL score (in thousands) were 11.5 (1–23.0), 25 (1–45), 104 (37–364), and 25.9 (0.4–136.6), respectively.

Table 1 Sociodemographic characteristics, lifestyle factors and physical condition of CPF exposed farmers grouped according to the cumulative exposure level

Variable	Cumulative Exposure Level		<i>p</i> -value
	High (<i>n</i> = 71)	Low (<i>n</i> = 81)	
Age (years) (mean \pm SD)	51.49 \pm 8.6	48.52 \pm 9.92	0.052 ^{tt}
Member of farmer's society (n %)	66 (93)	75 (92.6)	0.931 ^{tt}
Male (n %)	65 (91.5)	72 (88.9)	0.583 ^{tt}
Low educational level (n %)	65 (91.5)	67 (82.7)	0.108 ^{tt}
Smoker (n %)	41 (57.7)	32 (39.5)	0.025 ^{tt}
Obese (n %)	16 (22.5)	14 (17.3)	0.417 ^{tt}

tt independent t-test, or chi-square

As shown in Table 1, seventy-one farmers (47%) out of 152 were classified as having a high CEL. The proportion of smokers was 48% and significantly higher in the high CEL group. Ten out of 132 subjects in low educational level had never attended formal education.

Significantly few farmers reported using pesticides according to the user instructions (2.0%), and all of them were in the low CEL group. As shown in Table 2, the high exposed group was characterised with a broader arable land area, longer daily working time, longer duration of spraying pesticides, and higher volume of mixture applied than the low exposure group. On the other side, the proportion of farmers who used more than three pesticides in the mixture was higher in the low exposure group. The number of days spraying per year was considered high, with >100 days per year on average.

There are numbers of similar conditions among study participants in terms of exposure during crop insecticides application. Preparing, mixing, loading, and spraying pesticide using a knapsack sprayer are carried out personally by each study participants in the open area. None of the subjects wore a respirator, coverall, or disposable outer work clothes. The proportion of aprons, goggles, and chemical gloves users in our study population was also tiny (Table 3). However, most of them frequently use long-sleeved clothes or long pants during farm work. Four subjects who used chemical gloves in pesticide exposed activity reported that gloves were only replaced when they were damaged and even then, they often continue using the damaged gloves.

All of the CPF used were in liquid form, with the majority using a concentration of 200 EC (98.7%). Ethylenebis-dithiocarbamate (EBDC) mancozeb and abamectin was the fungicide and insecticide most frequently used as an addition to CPF in our subjects, as shown in Table 4. Nearly 2 out of 3 additional pesticides used were in liquid form.

As shown in Fig. 1, the use of multiple pesticides is common in our study population. Only 5.9% of the farmers used a single pesticide (CPF) while the other 27, 38.2, and 28.9% used 2, 3, and more than 3 pesticide mixtures.

Using long-sleeved clothes and long pants while spraying pesticides were associated with lower cumulative exposure while the higher volume of mixture applied and broader acres of land were associated with higher cumulative exposure level after adjusted for age and gender (Table 5).

Discussion

In general, farmers in our study have lived most of their lives in this occupation. For them, farming methods and work practices have been taught and implemented over

Table 2 Agricultural work-related characteristics of CPF exposed farmers grouped according to the cumulative exposure level

Variable	Cumulative Exposure Level		p-value
	High (n = 71)	Low (n = 81)	
Arable land area (acres) ^a	0.25 (0.03–0.70)	0.15 (0.01–0.50)	0.001
Number of arable lands ^a	4 (1–13)	3 (1–9)	0.026
Daily work duration (hours) ^a	7 (3–10)	6 (3–10)	0.003
Spraying in the morning time (n %)	48 (67.6)	44 (54.3)	0.095 [†]
Duration of spraying pesticide (hours/day) ^a	0.57 (0.14–2.00)	0.30 (0.04–2.25)	< 0.001
Volume of the mixture applied (litre/day) ^a	27.2 (7.0–81.6)	14.6 (2.3–85.0)	< 0.001
Used more than 3 pesticides in mixture (n %)	15 (21.1)	30 (37.0)	0.032 [†]
Using a manually pressurised sprayer (n %)	13 (18.3)	23 (28.4)	0.145 [†]

^aMedian (minimum-maximum) with p-value by Mann-Whitney test, or Chi-square

many years. The high number of spraying days per year and the use of multiple pesticide mixtures, while not using proper PPE during agricultural activities is a common practice among them.

Our study showed that the high exposure group's intensity level was significantly higher compared to the low exposure group due to the significantly higher scores for PPE utilisation, personal hygiene practices, and spill treatment. Since proper PPE utilisation was significant in the exposure reduction strategy, choosing not to use proper PPE will result in a higher internal dose. Several studies have covered the issue that proper use of

PPE was significantly associated with lower dimethyl metabolites [15], lower DAP concentrations [16] and the use of full-body coveralls during pesticides handling and spraying was significantly associated with lower OP metabolites level [17].

Dermal exposure and inhalation are the main routes of exposure for agricultural pesticides exposure [11]. All of the CPF used in our subjects were in emulsifiable concentrates that are readily absorbed through skin contact. Thus, direct contact should be avoided, and proper dermal protectors such as chemical gloves, coverall, or apron will reduce the exposure dose [18]. Among our

Table 3 Distribution of PPE usage, work clothes and work practices of the study population

Variable	Frequency - n (%)	
	Rare / never	Frequent
Personal Protective Equipment		
Apron	150 (98.7)	2 (1.3)
Face mask	79 (52.0)	73 (48.0)
Goggles	151 (99.3)	1 (0.7)
Chemical gloves	148 (97.4)	4 (2.6)
Boots ^a	64 (42.1)	88 (57.9)
Work clothes		
Long-sleeved clothes	15 (9.9)	137 (90.1)
Long pants	14 (9.2)	138 (90.8)
Work practices		
Wiping sweat with work clothes	123 (80.9)	29 (19.1)
Re-enter the field after spraying	119 (78.3)	33 (21.7)
Spraying against the wind	151 (99.3)	1 (0.7)
Splashed or spilled during spraying	19 (12.5)	133 (87.5)
Splashed or spilled while loading the pesticide	28 (18.4)	124 (81.6)
Eat in the middle of the work-time	147 (96.7)	5 (3.3)
Direct contact with pesticides	41 (27.0)	111 (73.0)
Proper shower after spraying	12 (7.9)	140 (92.1)
Changing clothes after spraying	7 (4.6)	145 (95.4)

^ap = 0.001 by chi-square, indicates lower proportion of frequent users in high cumulative exposure group

Table 4 The proportion of the type of pesticide used besides chlorpyrifos among the study population

Active ingredient	Chemical class	Utilisation	Frequency (n %)
Mancozeb	Carbamate	Fungicide	87 (572)
Abamectin	Avermectin	Insecticide	57 (375) ^a
Difenoconazole	Triazoles	Fungicide	49 (322)
Emamectin	Avermectin	Insecticide	17 (112)
Lambda cyhalothrin	Pyrethroid	Insecticide	14 (92)
Chlorfenapyr	Pyrole	Insecticide	12 (79)
Beta-cyfluthrin	Pyrethroid	Insecticide	10 (66)
Lufenuron ^b	Benzamida	Insecticide	9 (59)
Methomyl	Carbamate	Insecticide	9 (59)
Fipronil	Phenylpyrazole	Insecticide	7 (46)
Dimethoate	Organophosphate	Insecticide	6 (39)
Imidacloprid	Neonicotinoid	Insecticide	6 (39)
Propineb	Carbamate	Fungicide	6 (39)
Deltamethrin	Pyrethroid	Insecticide	4 (26)
Profenofos	Organophosphate	Insecticide	4 (26)
Cypermethrin	Pyrethroid	Insecticide	4 (26)
Chlorantranilipride	Diamide	Insecticide	3 (20)
Acophate	Organophosphate	Insecticide	2 (13)
Dimethypo	Thioucap	Insecticide	1 (07)
Chlorothalonil	Chloronitriles	Fungicide	1 (07)
Mefenoxam	Phenylamides	Fungicide	1 (07)
Pyridostrobin	Carbamate	Fungicide	1 (07)
Phoxim	Organophosphate	Insecticide	1 (07)
Methoxyfenozide ^b	Benzohydraide	Insecticide	1 (07)
Spinetoram ^b	Spinosyn	Insecticide	1 (07)

^ap < 0.01 by chi square, indicates lower proportion of users in high cumulative exposure group

^b Product contains a mixture of Lufenuron + Emamectin

^b Product contains a mixture of Methoxyfenozide + Spinetoram

subjects, 73% had reported direct contact with concentrated pesticides product, and over 80% had reported being splashed or spilt during preparation or spraying activity. Contradictory, we found that the most frequently used PPE in our study population were face mask (cloth masks or surgical masks) and boots which did not provide sufficient protection against CPF exposure. However, we also found that appropriate clothing (ie. long-sleeved clothes and long pants) while spraying pesticides were associated with lower cumulative exposure. These findings are relevant to reduced exposure because long-sleeved clothes and long pants provide a partial barrier against direct contact due to splashes or spills [11, 18]. The proportion of proper PPE use in our study population was 2% while the proportion of 'no PPE used' was 15%. The similar condition of low frequency of PPE use has been reported by several studies with agricultural workers in different countries [4, 19–24].

The Hierarchy of Controls defined by NIOSH begins with the most effective measures which are eliminating the hazard, followed by substitution, engineering controls, administrative controls, and the least effective controls, the PPE [25]. The elimination, substitution, and engineering controls will be very difficult to implement in the informal agricultural settings, leaving only 2 options. Many people rely on PPE as the last resort. However, it is generally accepted that advising the use of PPE alone does not always result in adequate protection [26]. For that, the administrative control to change the way they work has to be put in place together with the use of PPE. Regarding the hygiene practices and spill treatment, we found that nearly all of our subjects reported having

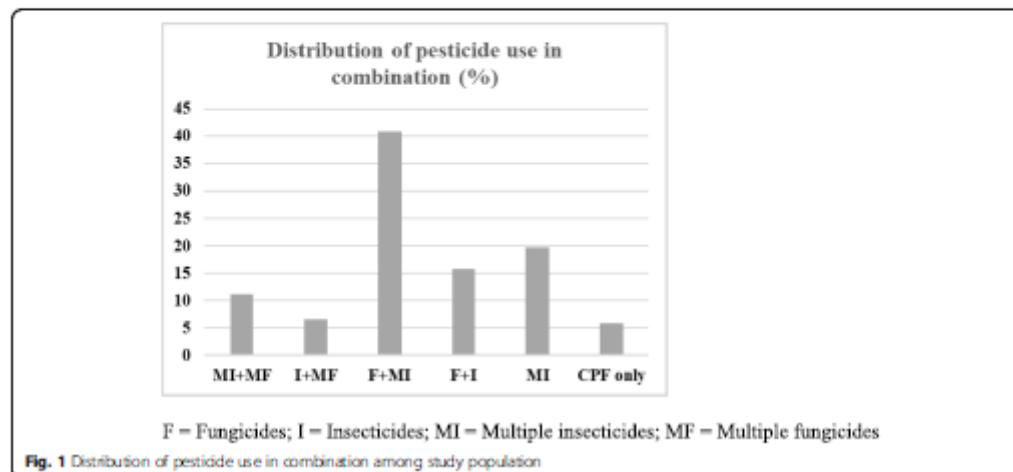


Table 5 Multiple linear regression analysis of cumulative exposure

Variable	B	SE (B)	Beta	95% CI (Lower; Upper)	p
Age (years)	0.791	0.165	0.319	0.47; 1.18	< 0.001
Arable land area (sares)	52.633	15.437	0.289	22.12; 83.14	0.001
Volume of the mixture applied (L/day)	0.329	0.107	0.259	0.19; 0.54	0.002
Long pants (work clothes)	-5.691	2.478	-0.160	-10.59; -0.79	0.023
Long-sleeved clothes (work clothes)	-4.834	2.111	-0.160	-9.01; -0.66	0.023

B Parameter estimate, SE (B) Standard error for B

Coding for the use of work clothes are as follows: 0 = never, 1 = rarely, 2 = often, 3 = always
R² = 0.361; Adjusted R² = 0.339

proper showering and changing clothes after spraying, just in agreement with the results from other researchers [4, 27]. All farmers also claim to wash their hands after being exposed to pesticides and before eating. We suggested this represents a more general attitude rather than acceptable practices in exposure reduction as reported in the previous study in Iran and Indonesia that there is no consistency between perception and work practices [4, 21]. Nevertheless, changing clothes was found to be significantly associated with lower exposure levels, so this practice is as crucial as PPE utilisation, especially to control dermal exposure [17].

Our study also found that very few farmers reported the use of pesticides according to the user instructions. A previous study reported that the level of education promoted safety behaviours among farmers [21, 28, 29]. Farmers with higher education, in general, are having a good sense of safety behaviours during pesticides handling. Higher education will also help farmers to obtain relevant knowledge of work practices and choose the proper PPE [30]. Regarding the use of pesticides, 94% of our subjects reported using two or more pesticides. The high frequency of farmers using multiple pesticides was also found in other countries [19, 23]. Ethylene-bis-dithio-carbamate (EBDC) mancozeb and abamectin were the fungicide and insecticide most frequently used in our subjects, similar to the previous study [31].

Our findings provide a clearer picture of the Javanese farmers' characteristics in the informal agricultural sector in Indonesia and may also represent conditions in other countries.

There are some limitations to our study that should be taken into consideration while interpreting our results. All of the information regarding agricultural activities were self-reported by the farmers that may result in exposure misclassification. However, the possibility of misclassification has been limited by randomly asking several important questions to determine the answers' consistency. There are several parameters related to exposure doses that we could not get in the interview. We did not have information regarding the exact quantity of CPF or other pesticides used by the farmers. We also

did not have the exact information about the length of time for proper showering or thorough hand washing after direct exposure or after pesticides handling.

Conclusions

In conclusion, despite the above limitations, the results showed that our study population was characterised by the low frequency of PPE usage, especially the use of dermal protectors and poor work practices (i.e. hygiene practices and spill treatment). As an addition to CEL, the occupational characteristics such as a higher volume of mixtures applied, broader arable areas, and extra coverage work clothes also determine the exposure dose. These findings indicate an inadequate knowledge of how to use pesticides properly, unawareness of the potential health impacts, and how to manage the exposure. We recommend the administrative control through comprehensive training on pesticide use and mentoring for farmers. In addition, we also encourage the use of proper PPE, particularly dermal protector, and proper work clothes during pesticide handling to reduce the exposure level.

Abbreviations

CEL: Cumulative Exposure Level; CPF: Chlorpyrifos; EBDC: Ethylene-bis-dithio-carbamate; IL: Intensity Level of pesticide exposure; OP: Organophosphate; PPE: Personal Protective Equipment

Acknowledgements

We are very grateful to all farmers who participated in this research. We also thank the support team for their contribution during the preparation phase and assistance during the recruitment.

Authors' contributions

LF: participated in the design of the study, collected and processed the data, conducted the statistical analysis and wrote the first draft of the manuscript. MM: participated in the study's design, supervised the data collection and statistical analysis, assist and provided valuable insight for revising the manuscript. DSS, AK: participated in the study's design, supervised the statistical analysis and provided valuable insight for revising the manuscript. IS, RDS, DAS, SGM, BP: participated in the study's design and provided valuable feedback and helped shape the manuscript. All authors have read and approved the manuscript.

Funding

This research was supported by Prodia Group. The funders had no role in the design of the study, in the collection, analysis, and interpretation of data, or in the writing of the manuscript and the decision to publish.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations**Ethics approval and consent to participate**

The study protocol was approved by the Ethical Committee of the Faculty of Medicine Universitas Indonesia on March 23, 2020 (No. KET-339/MUN2.F1.ETK/PPM.002/2020). Written informed consent was obtained from all subjects.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Doctoral Program, Faculty of Medicine Universitas Indonesia, Jakarta 10430, Indonesia. ²Department of Occupational Health and Safety, Faculty of Medicine and Health Science Universitas Kristen Krida Wacana, Jakarta 11510, Indonesia. ³Community Medicine Department, Faculty of Medicine Universitas Indonesia, Jakarta 10320, Indonesia. ⁴Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine Universitas Indonesia, Jakarta 10430, Indonesia. ⁵Department of Pharmacology and Therapeutics, Faculty of Medicine Universitas Indonesia, Jakarta 10430, Indonesia. ⁶Department of Biology, Faculty of Medicine Universitas Indonesia, Jakarta 10430, Indonesia. ⁷Ejleman Institute for Molecular Biology, National Research and Innovation Agency, Jalan Diponegoro No. 69, Kota Jakarta Pusat, Jakarta, Indonesia. ⁸Proda Occupational Health Institute International, Jakarta 10430, Indonesia.

Received: 4 March 2021 Accepted: 27 May 2021

Published online: 05 June 2021

References

- Casida JE, Bryant RJ. The ABCs of pesticide toxicology: amounts, biology, and chemistry. *Toxicol Res (Camb)*. 2017;6(6):755–63. <https://doi.org/10.1039/c6tx00199c>.
- Maden E, Wulansari M, Koomen I. Occupational Pesticide Exposure in Vegetable Production: A literature and policy review with relevance to Indonesia. Netherlands vegMPACT; 2014.
- Gangemi S, Miozzi E, Teodoro M, Briguglio G, De Luca A, Alibrando C, et al. Occupational exposure to pesticides as a possible risk factor for the development of chronic diseases in humans (review). *Mol Med Rep*. 2016;14(5):4475–88. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5817>.
- Yuantari MG, Van Gestel CA, Van Straalen NM, Widanarko B, Sunoko HR, Shohib MN. Knowledge, attitude, and practice of Indonesian farmers regarding the use of personal protective equipment against pesticide exposure. *Environ Monit Assess*. 2015;187(3):142. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4871-3>.
- Dhananjayan V, Ravichandran B. Occupational health risk of farmers exposed to pesticides in agricultural activities. *Curr Opin Environ Sci Health*. 2018;431–7. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.201807.005>.
- Goldner WS, Sandler DP, Yu F, Hopplin JA, Kamei F, Levan TD. Pesticide use and thyroid disease among women in the agricultural health study. *Am J Epidemiol*. 2010;171(4):455–64. <https://doi.org/10.1093/aje/kwp404>.
- Khan K, Ismail AA, Abdel Rasoul G, Bonner MR, Lasarev MR, Hendy O, et al. Longitudinal assessment of chlorpyrifos exposure and self-reported neurological symptoms in adolescent pesticide applicators. *BMJ Open*. 2014;4(3):e004177. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2013-004177>.
- Ventura C, Nieto MR, Bourguignon N, Lux-Lantos V, Rodriguez H, Cao G, et al. Pesticide chlorpyrifos acts as an endocrine disruptor in adult rats causing changes in mammary gland and hormonal balance. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016;156:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.10.010>.
- Sheetha S, Parks CG, Goldner WS, Kamei F, Umbach D, Ward M, et al. Pesticide use and incident hypothyroidism in pesticide applicators in the agricultural health study. *Environ Health Perspect*. 2018;126(9):1–12.
- Li J, Ren F, Li Y, Luo J, Pang G. Chlorpyrifos induces metabolic disruption by altering levels of reproductive hormones. *J Agric Food Chem*. 2019;67(38):10553–62. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03602>.
- Damalas CA, Koutoubas SD. Farmers' Exposure to Pesticides: Toxicity Types and Ways of Prevention. *Toxics*. 2016;4(1):1.
- Kim KH, Kabir E, Jahan SA. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci Total Environ*. 2017;575:525–35. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.009>.
- Machado SC, Martins I. Risk assessment of occupational pesticide exposure: use of endpoints and surrogates. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2018;98:276–83. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.08.008>.
- Dosemeci M, Abvanja MC, Rowland AS, Mage D, Zahm SH, Rothman N, et al. A quantitative approach for estimating exposure to pesticides in the agricultural health study. *Ann Occup Hyg*. 2002;46(2):245–60. <https://doi.org/10.1093/annhyg/mef011>.
- Seezen M, Lucchini RG, Siritutanapruk S, Sapbamer R, Hongsilbsong S, Woskie S, et al. Association between Organophosphate Pesticide Exposure and Insulin Resistance in Pesticide Sprayers and Nonfarmworkers. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(2):8140.
- Aguiar-Garduno C, Blanco-Munoz J, Roxana Antonio K, Escamilla-Nunez C, Juarez-Perez CA, Schilman A, et al. Occupational predictors of urinary dialkyl phosphate concentrations in Mexican flower growers. *Int J Occup Environ Health*. 2017;23(2):151–9. <https://doi.org/10.1080/10773525.2017.13441676>.
- Kouras M, Tsakalof A, Tzatzarakis M, Valonaki E, Tsatrakis A, Hadjichristodoulou C. Biomonitoring of organophosphate exposure of pesticide sprayers and comparison of exposure levels with other population groups in Thessaly (Greece). *Occup Environ Med*. 2014;71(2):126–33. <https://doi.org/10.1136/oemed-2013-101490>.
- Madafarane E, Carey R, Keegel T, El-Zaemay S, Fritsch L. Dermal exposure associated with occupational end use of pesticides and the role of protective measures. *Saf Health Work*. 2013;4(3):136–41. <https://doi.org/10.1016/j.shaw.2013.07.004>.
- Barron Cuenca J, Tirado N, Vilstrom M, Lindh CH, Stenius U, Leander K, et al. Pesticide exposure among Bolivian farmers: associations between worker protection and exposure biomarkers. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. 2020;30(4):730–42. <https://doi.org/10.1038/s41370-019-0128-3>.
- Lu J. Ergonomic and health assessment of farmers' multi-pesticide exposure. *Ergonomics SA*. 2017;29(1):20–35.
- Sharifadeh MS, Abdolazadeh G, Damalas CA, Rezaei R, Ahmadyouefi M. Determinants of pesticide safety behavior among Iranian rice farmers. *Sci Total Environ*. 2019;651(Pt 2):2953–60. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.179>.
- Okonya JS, Kroschel J. A cross-sectional study of pesticide use and knowledge of smallholder potato farmers in Uganda. *Biomed Res Int*. 2015;2015:759049.
- Kapelela JA, Sauli E, Sadiq O, Ndakidem PA. Biomonitoring of acetylcholinesterase (AChE) activity among smallholder horticultural farmers occupationally exposed to mixtures of pesticides in Tanzania. *J Environ Public Health*. 2019;2019:3084301.
- Leimen J, Bernieri T, Rodrigues S, Suyenaga ES, Ardenghi PG. Pesticide exposure and health conditions among orange growers in southern Brazil. *J Environ Sci Health B*. 2018;53(4):215–21. <http://doi.org/10.1080/03001234.2017.1421823>.
- NIOSH Hierarchy of Controls The National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH); 2015 [updated January 13, 2015; cited 2021 April 28]. Available from: <https://www.cdc.gov/niosh/topics/hierarchy/default.html>.
- Garrigou A, Laurent C, Berthet A, Colosio C, Jas N, et al. Critical review of the role of PPE in the prevention of risks related to agricultural pesticide use, vol. 123. Safety Science, Elsevier; 2020. p. 104527.
- Callahan CL, Hamad LA, Olson JR, Ismail AA, Abdel-Rasoul G, Hendy O, et al. Longitudinal assessment of occupational determinants of chlorpyrifos exposure in adolescent pesticide workers in Egypt. *Int J Hyg Environ Health*. 2017;220(8):1356–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.09.006>.
- Damalas CA, Koutoubas SD. Farmers' behaviour in pesticide use: a key concept for improving environmental safety. *Curr Opin Environ Sci Health*. 2018;427–30. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2018.07.001>.
- Geleta DH, Alemayehu M, Asrade G, Mekonnen TH. Low levels of knowledge and practice of occupational hazards among flower farm workers in southwest Shewa zone, Ethiopia: a cross-sectional analysis. *BMC Public Health*. 2021;21(1):232. <https://doi.org/10.1186/s12889-021-10254-5>.
- Li J, Dong L, Tian D, Zhao Y, Yang H, Zhi X, et al. Association between pesticide exposure intensity and self-rated health among greenhouse

vegetable farmers in Ningxia, China. *PLoS One*. 2018;13(12):e0209566. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209566>.

31. Schilmann A, Lacasana M, Blanco-Munoz J, Aguilar-Garduno C, Salinas-Rodriguez A, Flores-Aidana M, et al. Identifying pesticide use patterns among flower growers to assess occupational exposure to mixtures. *Occup Environ Med*. 2010;67(5):323–9. <https://doi.org/10.1136/oem.2009.047175>.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

