

**PENGARUH FREKUENSI PAPARAN ASAP ROKOK DAN VITAMIN D
TERHADAP KADAR GLUKOSA DARAH PUASA**
Studi Eksperimental pada Tikus Rattus Novergicus

Skripsi

Untuk memenuhi Sebagian persyaratan
guna mencapai gelar Sarjana Kedokteran



Diajukan oleh :

Dwi Yulianto

30101900070

FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG
2023

SKRIPSI
PENGARUH FREKUENSI PAPARAN ASAP ROKOK DAN VITAMIN D
TERHADAP KADAR GLUKOSA DARAH PUASA
Studi Eksperimental Pada Tikus Rattus Novergicus

Yang dipersiapkan dan disusun oleh:

Dwi Yulianto

30101900070

Telah dipertahankan di depan Dewan Penguji
pada tanggal 30 Maret 2023
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Susunan Tim Penguji

Pembimbing I



dr. Arini Dewi Antari, M.Biomed

Pembimbing II



dr. M. Saugi Abduh, Sp.PD, KKV, FINASIM

Anggota Tim Penguji I



Dr. dr. Chodidjah, M.Kes

Anggota Tim Penguji II



dr. Ika Rosdiana, Sp.KFR

Semarang, 30 Maret 2023

Fakultas Kedokteran

Universitas Islam Sultan Agung

Dekan,



Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Dwi Yulianto

NIM : 30101900070

Dengan ini menyatakan bahwa Karya Tulis Ilmiah yang berjudul **“Pengaruh Frekuensi Paparan Asap Rokok Dan Vitamin D Terhadap Kadar Glukosa Darah Puasa** Studi Eksperimental Pada Tikus Rattus” adalah benar hasil karya saya dan dikerjakan dengan penuh kesadaran bahwa saya tidak melakukan tindakan plagiasi atau mengambil seluruh atau sebagian karya tulis orang lain tanpa menyebutkan sumbernya. Jika saya terbukti melakukan tindakan plagiasi, saya bersedia menerima sanksi sesuai dengan aturan yang berlaku.

Semarang, 30 Maret 2023



Dwi Yulianto



PRAKATA

Assalamualaikum Wr.Wb

Dengan memanjatkan puji syukur atas kehadiran Allah SWT atas segala limpah Rahmat dan Hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan karya tulis ilmiah ini.

Skripsi yang berjudul “**Pengaruh Frekuensi Paparan Asap Rokok Dan Vitamin D Terhadap Kadar Glukosa Darah Puasa** Studi Eksperimental Pada Tikus *Rattus Novergicus*” disusun untuk memenuhi persyaratan dalam mencapai gelar sarjana Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Terselesaikannya penyusunan karya tulis ilmiah ini tidak lepas dari dukungan dan bantuan berbagai pihak. Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terimakasih sebesar – besarnya kepada :

1. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, Sp.KF, SH selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
2. dr. Arini Dewi Antari, M.Biomed dan dr. H. M. Saugi Abduh, Sp.PD, KKV, FINASIM selaku Dosen Pembimbing yang telah sabar dan penuh kesanggupan memeberikan bimbingan, saran dan dorongan sehingga penyusunan Karya Tulis Ilmiah ini dapat selesai.
3. Dr. dr. Chodidjah, M.Kes dan dr. Ika Rosdiana, Sp.KFR selaku dosen penguji yang telah bersedia memberikaan waktunya dalam menguji dan memberi kritik juga saran Karya Tulis Ilmiah ini.
4. Keluarga saya tercinta yang telah memberikan doa dan dukungan sehingga saya dapat menyelesaikan skripsi ini.
5. Untuk teman kelompok KTI saya yang memberikan motivasi dan dukungan kepada saya untuk mengerjakan skripsi ini.
6. Dan untuk teman, saudara kontrakan blue wall/singgasana yang tidak bisa saya sebutkan semuanya.

Penulis menyadari bahwa Karya Tulis Ilmiah ini masih jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu, penulis mengharapkan saran dan kritik yang membangun dan perbaikan.

Akhir kata penulis berharap semoga Karya Tulis Ilmiah ini dapat bermanfaat bagi masyarakat, *civitas academia* FK UNISSULA dan menjadi salah satu sumbangan dunia ilmiah dan kedokteran.

Wassalamu'alikum wr. Wb

Semarang, Maret 2023



Penulis



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERSETUJUAN.....	Error! Bookmark not defined.
SURAT PERNYATAAN.....	ii
PRAKATA.....	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
INTISARI.....	xiii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1. Tujuan Umum	4
1.3.2. Tujuan Khusus	4
1.4. Manfaat Penelitian.....	5
1.4.1 Manfaat Teoritis.....	5
1.4.2 Manfaat Praktis	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Asap Rokok	6
2.1.1 Kandungan.....	6
2.1.2 Frekuensi Paparan Asap Rokok.....	7
2.1.3 Efek Asap Rokok.....	8
2.2 Kadar Glukosa Darah Puasa	11
2.2.1 Metabolisme Kadar Glukosa Darah Puasa	11
2.2.2 Efek Kadar Glukosa Darah Puasa	12
2.3 Vitamin D	13
2.3.3 Metabolisme Vitamin D	14

2.3.1 Efek Vitamin D pada tubuh	15
2.4 Hubungan antara asap rokok, kadar glukosa darah puasa, dan vitamin D	17
2.5 Kerangka Teori	19
2.6 Kerangka Konsep.....	20
2.7 Hipotesis	20
BAB III METODE PENELITIAN.....	21
3.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	21
3.2 Variabel dan Definisi Operasional.....	23
3.2.1 Variabel Penelitian	23
3.2.2 Definisi Operasional	23
3.3 Populasi dan Sampel.....	24
3.3.1 Populasi Penelitian	24
3.3.2 Sampel Penelitian	24
3.4 Instrumen dan Bahan Penelitian	25
3.4.1 Instrumen Penelitian.....	25
3.4.2 Bahan Penelitian	25
3.5 Cara Penelitian.....	25
3.5.1 Persiapan Penelitian.....	25
3.5.2 Pembuatan Suplemen Vitamin D	25
3.5.3 Pelaksanaan Penelitian	26
3.5.4 Pengambilan Sampel Darah.....	27
3.5.5 Melakukan Pemeriksaan Kadar Glukosa Darah	27
3.6 Tempat dan Waktu.....	28
3.6.1 Tempat Penelitian	28
3.6.2 Waktu Penelitian	28
3.7 Alur Kerja Penelitian	29
3.8 Analisis Data.....	30
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	31
4.1 Hasil Penelitian.....	31
4.1.1 Deskriptif data.....	31

4.1.2 Distribusi Data	33
4.1.3 Analisis Multivariat.....	34
4.2 Pembahasan	35
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	40
5.1 Kesimpulan.....	40
5.2 Saran	40
DAFTAR PUSTAKA	42
LAMPIRAN.....	46



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Efek Seluler CO, HO-1 dan biliverdin di jalan napas	11
Gambar 2. 2 Keseimbangan ROS dan Antioksidan	13
Gambar 2. 3 Kerangka Teori.....	19
Gambar 2. 4 Kerangka Konsep Penelitian	20
Gambar 3. 1 Skema Rancangan Penelitian	21
Gambar 3. 2 Alur Penelitian	29
Gambar 4. 1 Grafik Rerata Jumlah Kadar Glukosa Darah Puasa	32



DAFTAR TABEL

Tabel 4.1. Hasil Rerata Kadar Glukosa Darah Puasa.....	32
Tabel 4.2. Hasil Uji Normalitas Jumlah Kadar Glukosa Darah Puasa.....	33
Tabel 4.3. Hasil Uji Homogenitas Jumlah Kadar Glukosa Darah Puasa	Error!
Bookmark not defined.	34
Tabel 4.4. Hasil Uji One Way Annova	34
Tabel 4.5. Hasil Uji Post Hoc Tamhane's.....	35



DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH

25 (OH)D	= 25-hydroxyvitamin D 25(OH)D
CB	= Calbindin
CO	= Carbon Monoxide
CYP27A1	= Cytochrome P450 Family 27 Subfamily A Member 1
CYP2R1	= Cytochrome P450 Family 2 Subfamily R Member 1
CYP27B1	= Cytochrome P450 Family 27 Subfamily B Member 1
FGF-23	= Fibroblast growth factor 23
G-AUC	= The Glucose Area Under The Curve
GOD-PAP	= Glucose Oxidative Peroxidase
HO-1	= Heme oxygenase 1
iNOS	= Inducible Nitric Oxide Synthase
LPS	= Lipopolysaccharide
mRNA	= Messenger RNA
nAChRs	= Nicotinic acetylcholine receptors
NADPH	= Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NNA	= 1-(N-methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridinyl)-4-butanal (NNA)
NNK	= 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone
NNN	= N'-nitrosonornicotine
PDIA3	= Protein disulfide-isomerase A3
PMCA	= Protein Misfolding Cyclic Amplification
PTH	= Paratiroid Hormone
ROS	= Reactive Oxygen Species
TNF- α	= Tumor Necrosis Factor - α
TSNA 1	= Tobacco-Specific Nitrosamines 1
UVB	= Ultraviolet B
VDRE	= Vitamin D Response Element

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1: Sampel Penelitian	47
Lampiran 2: Hasil SPSS.....	48
Lampiran 3: <i>Ethical Clearance</i>	51
Lampiran 4: Surat Ijin Pengambilan Data.....	52
Lampiran 5: Surat Selesai Penelitian	53
Lampiran 6: Foto Penelitian.....	47



INTISARI

Paparan asap rokok dengan frekuensi yang berbeda diduga dapat memicu berbagai masalah gangguan metabolisme dan meningkatnya stres oksidatif yang berkaitan erat dengan meningkatnya kadar glukosa darah puasa. Vitamin D sebagai antioksidan yang berhubungan dengan kontrol glikemik diduga dapat menurunkan kadar glukosa darah puasa. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh frekuensi paparan asap rokok terhadap glukosa darah puasa pada tikus yang diberi Vitamin D.

Jenis penelitian adalah eksperimental dengan desain *posttest only control group*. Data diambil dari 25 sampel darah tikus dari 5 kelompok, kemudian darah di sentrifugasi dan diukur kadar glukosa darah puasa di Laboratorium IBL Unissula Semarang. Data selanjutnya dianalisis melewati uji *one way annova* dan menggunakan *posthoc tamhane's*.

Pada hasil data sampel didapatkan perbedaan nilai p ($p < 0,05$) yang signifikan antar semua kelompok kecuali K1 dan K2. Penelitian ini didapatkan bahwa frekuensi paparan asap rokok menurunkan kadar glukosa darah puasa pada tikus *Rattus Norvegicus* yang diberi vitamin D dengan perbedaan rerata kadar glukosa darah puasa pada tikus *Rattus Norvegicus* yang tidak terpapar asap rokok dan diberi vitamin D sebesar $14,33 \pm 4,26$ mg/dL, pada tikus *Rattus Norvegicus* yang terpapar paparan asap rokok dengan frekuensi 1x8 dan diberi vitamin D sebesar $20,05 \pm 4,26$ mg/dL, dan rerata kadar glukosa darah puasa pada tikus *Rattus Norvegicus* yang terpapar paparan asap rokok dengan frekuensi 2x4 dan diberi vitamin D sebesar $22,85 \pm 6,96$ mg/dL.

Terdapat pengaruh frekuensi paparan asap rokok dan vitamin D terhadap kadar glukosa darah puasa pada tikus

KATA KUNCI : Frekuensi Paparan Asap Rokok, Kadar Glukosa Darah Puasa, Vitamin D

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Asap rokok mengandung banyak konstituen yang dapat menimbulkan gangguan metabolisme di tubuh contohnya pada sistem pernapasan, penyakit jantung seperti infark miokard, sampai stroke (Boukhenouna *et al*, 2018). Rokok mengandung berbagai macam senyawa, salah satunya nikotin yang terbukti menyebabkan resistensi reseptor insulin pada jaringan, menurunkan sekresi insulin di sel β pankreas sehingga menyebabkan terjadinya peningkatan kadar glukosa darah (Bajaj, 2012). Hingga saat ini, perbedaan individu dalam merokok mempunyai kebiasaan tersendiri, contohnya perokok kretek lebih sering menyalakan rokoknya nyala dengan menghisap lebih sering, dimana perbedaan frekuensi merokok diperkirakan berkorelasi dengan konsentrasi bahan rokok seperti karbon monoksida (CO) (Inayatillah *et al*, 2014). Paparan CO dan zat-zat dalam rokok lainnya yang lama dapat memicu peningkatan stres oksidatif. Stres oksidatif yang tinggi dapat menimbulkan cedera sel, khususnya pada sel β pancreas, serta dapat meningkatkan laju glukoneogenesis dan glikogenolisis yang selanjutnya dapat meningkatkan kadar gula darah (Hilawe *et al*, 2015; Vu *et al*, 2014). Penelitian dari Pan *et al* (2015) menyebutkan bahwa merokok menjadi faktor risiko terkena diabetes tipe 2 dan meningkat seiring dengan jumlah kumulatif rokok yang dihisap. *World Health Organization* (WHO) mengungkapkan rokok menyebabkan kematian lebih

dari 8 juta orang per tahun, di mana sekitar 7 juta dari kematian ini disebabkan oleh penggunaan tembakau langsung, sementara sekitar 1,2 juta dikaitkan dengan paparan asap rokok orang bukan perokok., ini menjadikan Indonesia peringkat ketiga dunia dalam hal perokok aktif (Kementrian Kesehatan Republik Indonesia, 2020). *Global Adult Tobacco Survey* (2021), program yang dirilis oleh Kementerian Kesehatan Indonesia memberitahukan bahwa jumlah perokok dewasa meningkat 8,8 juta orang dari 60,3 juta pada tahun 2011 menjadi 69,1 juta perokok pada tahun 2021. Meskipun prevalensi merokok di Indonesia menurun dari 1,8% menjadi 1,6%. Masalah paparan asap rokok yang berkepanjangan dapat memicu berbagai masalah gangguan metabolisme dan meningkatnya stres oksidatif yang berkaitan erat dengan meningkatnya kontrol glikemik dan status prooksidan yang lebih tinggi (Matough *et al*, 2012). Antioksidan serta prohormon yang berperan penting dalam kontrol glikemik adalah vitamin D. Prevalensi defisiensi vitamin D kebanyakan disebabkan oleh paparan sinar matahari yang tidak cukup yang menyebabkan kadar kalsifediol yang bersirkulasi di darah rendah (*25-hidroksi-vitamin D*), serta kurangnya asupan dari sumber makanan, dan malabsorpsi vitamin. Penelitian Nimitphong dan Holick (2013) mengungkapkan walaupun suatu negara dilewati garis ekuator, namun banyaknya sinar matahari yang mencapai permukaan bumi berkurang adanya polusi udara, yang menyerap sinar *ultraviolet B*.. Perbedaan pigmentasi kulit dan umur seseorang juga dapat memengaruhi pembuatan vitamin D di kulit dan kebiasaan masyarakat yang malas berjemur pada saat waktu yang baik untuk berjemur mengakibatkan

terjadinya ketidakcukupan vitamin D. Vitamin yang bersumber dari makanan tidak cukup memenuhi zat gizi, sehingga suplemen vitamin dalam dosis bisa digunakan sebagai alternatif, ditambah suplementasi vitamin D mudah dikonsumsi, murah, dan aman (Tsur *et al*, 2013).

Mekanisme hubungan paparan asap rokok dengan peningkatan kadar glukosa dipengaruhi oleh kandungan nikotin dalam asap rokok sehingga memengaruhi sekresi insulin lewat reseptor sel β pankreas. Paparan jangka pendek terhadap konsentrasi nikotin di atas $1\mu\text{mol/L}$ menghambat pelepasan insulin (Dwi Ario, 2014). Temuan ini menunjukkan bahwa reseptor nikotinik fungsional dan bagian nikotinik di sel β pancreas serta pulau pancreas secara negatif memengaruhi fungsi sel β pancreas (Dwi Ario, 2014).. Vitamin D dapat mendukung fungsi insulin dengan meningkatkan sensitivitas insulin serta mengatur homeostasis glukosa dengan merangsang pelepasan insulin dari sel β pancreas (Valladares *et al*, 2019). Vitamin D juga dapat mengatur sintesis faktor neurotopik dan memicu neurogenesis untuk kepentingan diferensiasi dan kelangsungan hidup sel (Morello *et al*, 2018). Berdasarkan penelitian Lolita *et al* (2020) pada kelompok yang terpapar asap rokok terjadi penurunan kadar glukosa darah yang bermakna setelah pemberian vitamin D dibanding kelompok kontrol yang hanya dipapar asap rokok. Vitamin D merangsang produksi insulin di sel β pankreas. Ketika ada cukup vitamin D, sel beta di pankreas cukup terstimulasi untuk memproduksi insulin yang cukup untuk memasukkan gula darah ke dalam sel (Hermawan D, 2016). Vitamin D yang menurun di dalam darah menyebabkan tidak terjadi pembentukan insulin di sel

β pancreas, sehingga diperlukan untuk lebih mengevaluasi peran potensial terapeutik vitamin D dalam mencegah penyakit pancreas yang berhubungan dengan peningkatan gula darah.

Peneliti berkeinginan untuk melakukan pengamatan mengenai pengaruh kebiasaan merokok yang berkaitan dengan frekuensi paparan asap rokok terhadap kadar glukosa darah, serta pentingnya menjaga kadar vitamin D yang cukup pada tubuh. Penelitian ini nantinya mengerucut pada pengaruh frekuensi paparan asap rokok terhadap kadar glukosa darah puasa pada tikus *Rattus Norvegicus* yang diberi vitamin D

1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat pengaruh frekuensi paparan asap rokok dan vitamin D terhadap kadar glukosa darah puasa pada tikus *Rattus Norvegicus* ?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui pengaruh frekuensi paparan asap rokok dan vitamin D terhadap kadar glukosa darah puasa pada tikus *Rattus Norvegicus*.

1.3.2. Tujuan Khusus

Untuk mengetahui perbedaan rerata kadar glukosa puasa tikus *Rattus Norvegicus* pada semua kelompok kontrol dan perlakuan.

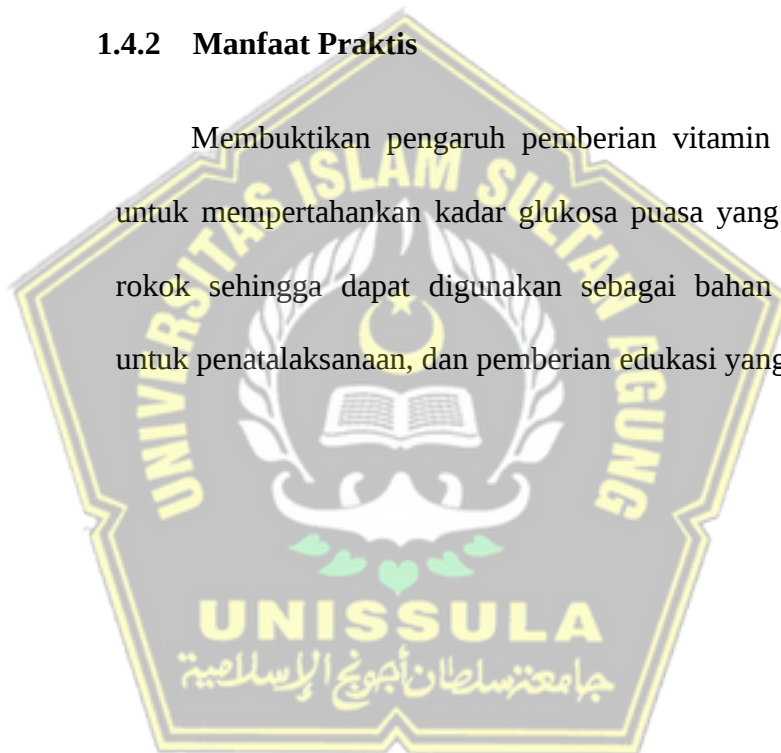
1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan pengetahuan di bidang kedokteran dan dasar penelitian lanjut mengenai frekuensi paparan asap rokok terhadap kadar glukosa darah pada tikus *Rattus Norvegicus* yang terpapar asap rokok.

1.4.2 Manfaat Praktis

Membuktikan pengaruh pemberian vitamin D yang tepat untuk mempertahankan kadar glukosa puasa yang terpapar asap rokok sehingga dapat digunakan sebagai bahan pertimbangan untuk penatalaksanaan, dan pemberian edukasi yang lebih tepat.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Asap Rokok

2.1.1 Kandungan

Asap rokok merupakan asap yang dihasilkan oleh pembakaran tembakau dalam bentuk cerutu, rokok putih, rokok kapur atau penggunaan cerutu yang terbuat dari *Nicotiana Tabacum*, *Nicotiana Rustica* atau jenis lainnya atau bahan sintetiknya, yang asapnya mengandung nikotin dan tar dengan atau tanpa bahan tambahan ribuan zat berbeda. Asap rokok terdapat radikal bebas dan senyawa kimia, seperti formaldehida, kadmium, nikel, arsenik, nitrosamin spesifik tembakau, dan fenol berkontribusi pada efek berbahaya dari merokok (Proctor, 2012).

Tar, nikotin, dan CO merupakan tiga macam bahan kimia yang paling berbahaya dalam asap rokok. Kandungan nikotin dan tar, dan komponen toksik lain pada rokok kretek lebih tinggi dibandingkan dengan rokok putih (Joseph, 2016). Tar memasuki rongga mulut sebagai uap padat yang, ketika mendingin, mengeras dan membentuk endapan coklat pada permukaan gigi, saluran udara, dan paru-paru. Kadar nikotin sekitar 1-2% yang ada pada tembakau melalui saluran pernafasan, usus halus dan kulit, sehingga menimbulkan efek adiktif yang kuat. Sifat adiktif nikotin meningkat

dengan menghambat monomamine oxidase (Royal College of Physicians, 2016).

2.1.2 Frekuensi Paparan Asap Rokok

Frekuensi paparan asap rokok adalah jumlah paparan asap rokok yang terpapar dalam satuan batang rokok per hari (Ramadhan et al, 2017). Paparan asap rokok yang dihirup masuk melalui saluran napas dan paru-paru adalah organ pernapasan utama. Proses metabolisme CO dalam tubuh dapat terjadi melalui pernafasan, pembilasan (redistribusi) dan oksigenasi (Wu dan Wang, 2005). Ketika asap rokok dihirup, CO diserap melalui paru-paru, masuk ke aliran darah, kemudian berikatan dengan hemoglobin membentuk karboksihemoglobin (COHb), yang kadarnya dalam darah dapat diukur sebagai penanda asupan asap rokok. Selain itu, karena ada gradien konsentrasi di alveoli, CO dalam darah kembali ke alveoli, sehingga CO di udara yang dihembuskan dapat diukur dengan pengukur CO portabel (Soeroso et al., 2020).

Asap rokok akan berdampak langsung terhadap paru secara langsung dalam mekanisme peningkatan radikal bebas dan memicu respon inflamasi (Mangimbulude dan Karwur, 2013). Radikal bebas yang terbentuk berupa TSNA 1-(Nmetil-N-nitrosamino)-1-(3-piridinil)-4-butana (NNA), 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanon (NNK) dan N-nitrosonornicotine (NNN), formaldehida, n-metilformamida, nicotinaldehdye, kotinin dan aerosol organik

sekunder. (Mahabee-Gittens et al, 2021). Kelebihan radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh merusak paru-paru melalui mekanisme stres oksidatif, sehingga mengakibatkan kerusakan yang masif pada sel (Mangimbulude dan Karwur, 2013)

2.1.3 Efek Asap Rokok

Senyawa pada asap rokok yang berdampak terhadap sel berasal dari CO dan nikotin. Nikotin berpengaruh pada pelepasan katekolamin ke dalam aliran darah meningkatkan detak jantung dan tekanan darah, melepaskan asam lemak bebas dan memobilisasi gula darah. Nikotin meningkatkan induksi stres oksidatif, aktivasi faktor transkripsi, enzim pensintesis katekolamin tirosin hidroksilase dan mencegah apoptosis pada tingkat sel (Dwi Ario, 2014). Jalur nikotin di sel chromaffin dapat meningkatkan kadar glukosa darah dengan mengikat reseptor nikotik di ganglion di medulla adrenal, nikotin meningkatkan aliran adrenalin (epinefrin), hormone perangsang dan neurotransmitter. Ketika berikatan dengan reseptor, itu menyebabkan depolarisasi sel dan masuknya kalsium melalui saluran kalsium bergerbang voltase. Kalsium memicu eksitasi butiran chromaffin dan dengan demikian pelepasan epinefrin (dan norepinefrin) ke dalam aliran darah. Pelepasan epinefrin (adrenalin) meningkatkan detak jantung, tekanan darah dan pernapasan, serta meningkatkan kadar gula darah (Elaine N, 2015).

Nikotin menyebabkan resistensi insulin dengan mengaktifkan jalur inflamasi awal melalui reseptor makrofag $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine, diikuti peningkatan ekspresi tumor nekrosis faktor- α (TNF- α), menghasilkan peningkatan superoksida dan penurunan fosforilasi Akt, diasilgliserol disertai dengan peningkatan serin fosforilasi substrat reseptor insulin 1, dan translokasi glucose transporter 4 (Dwi Ario, 2014).

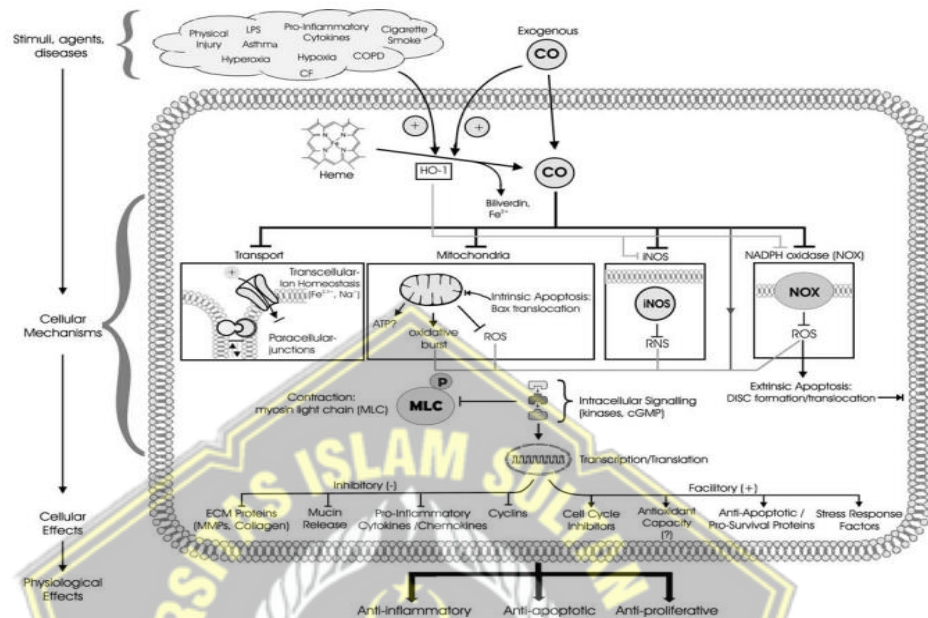
Penelitian Gausserès et al (2020) mendukung studi klinis yang menunjukkan bahwa paparan kronis terhadap nikotin dapat menyebabkan pengurangan fungsi sel pada perokok. Nikotin dapat mempengaruhi sekresi insulin melalui reseptor asetilkolin nikotinat (nAChRs) dalam sel β pankreas (Dwi Ario, 2014). Sekresi insulin dapat diatur oleh mekanisme ganglionik endogen pankreas. Telah dibuktikan bahwa cabang pankreas dari saraf vagus melepaskan asetilkolin (ACh) untuk mengatur fungsi sekresi, proliferasi, sinyal ketahanan sel β pankreas (Gausserès et al, 2020). Sejumlah penelitian in vitro menunjukkan bahwa nAChR ditemukan di ganglia pankreas dan memengaruhi sekresi insulin melalui mekanisme intraganglionik yang kompleks (Dwi Ario, 2014).

Stres oksidatif menghambat proses aktivasi enzim 3-kinase fosfatidilinositol dan menurunkan sekresi adiponektin yang dimana adinopektin nantinya merangsang fosforilasi dan aktivasi 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase di hati dan otot, sehingga

adiponektin berefek dalam sensitivitas insulin dan metabolisme gula darah (Vu et al., 2014).

Asap rokok mengandung CO yang dapat memicu perubahan fungsi seluler, yang dipromosikan di jalur napas terkait kejadian stresor sebagai akibat dari cedera, sehingga meningkatkan apoptosis, proliferasi, dan infiltrasi sel inflamasi (Ruiz & T. Ameredes, 2012). CO berdampak pada transport seluler, mitokondria, iNOS, NADPH oksidase seperti gambar 2.1 dimana paparan yang berlebihan dapat meningkatkan stres oksidatif. ROS yang dihasilkan oleh mitokondria memicu apoptosis melalui proses yang melibatkan pelepasan sitokrom c dalam sel INS-1 (Ruiz & T. Ameredes, 2012). Stres oksidatif menyebabkan aktivasi AMP-activated protein kinase (AMPK), penghambatan rapamycin (mTOR) target mamalia dan aktivasi c-Jun N-terminal kinase (JNK) dalam sel β pankreas. mTOR terutama merusak sel melalui memulai apoptosis yang dimediasi mitokondria melalui upregulation dari Thioredoxin-interacting protein (TXNIP), menginduksi disfungsi mitokondria, meningkatkan diferensiasi sel β pankreas, dan menurunkan sekresi insulin dan proliferasi sel β pancreas. Upregulasi JNK mengakibatkan penghambatan jalur IRS1/2/P13K, menghasilkan penghambatan mTOR dan translokasi nuklir dari forkhead box protein O1 (FOXO1). Pada gilirannya, translokasi nuklir FOXO1 menghasilkan nuklir Pdx1 pengecualian.

Secara keseluruhan, efek ini mengakibatkan penurunan massa sel , sekresi insulin, dan peningkatan diferensiasi sel (Eguchi et al., 2021).



Gambar 2. 1 Efek Seluler CO, HO-1 dan Biliverdin di Jalan (Ruiz dan T. Ameredes, 2012)

2.2 Kadar Glukosa Darah Puasa

2.2.1 Metabolisme Kadar Glukosa Darah Puasa

Metabolisme glukosa melibatkan beberapa proses, termasuk glikolisis, glukoneogenesis, dan glikogenolisis, dan glikogenesis. Glikolisis di hati merupakan proses yang melibatkan berbagai enzim yang mendorong katabolisme glukosa di dalam sel. Glikolisis adalah proses yang paling penting dalam melepaskan energi dari glukosa (Rodwell et al., 2015). Metabolisme glukosa dalam sel dapat membuat piruvat, asetil koenzim A dan laktat yang nantinya teroksidasi sempurna dan membuat energi, air, karbon dioksida (CO_2) disimpan dalam bentuk glikogen di hati atau otot (Rodwell et al., 2015). Hati

atau otot nantinya akan melepaskan glukosa dengan mengubahnya menjadi asam lemak dan disimpan dalam bentuk trigliserida atau asam amino protein structural (Rodwell et al., 2015).

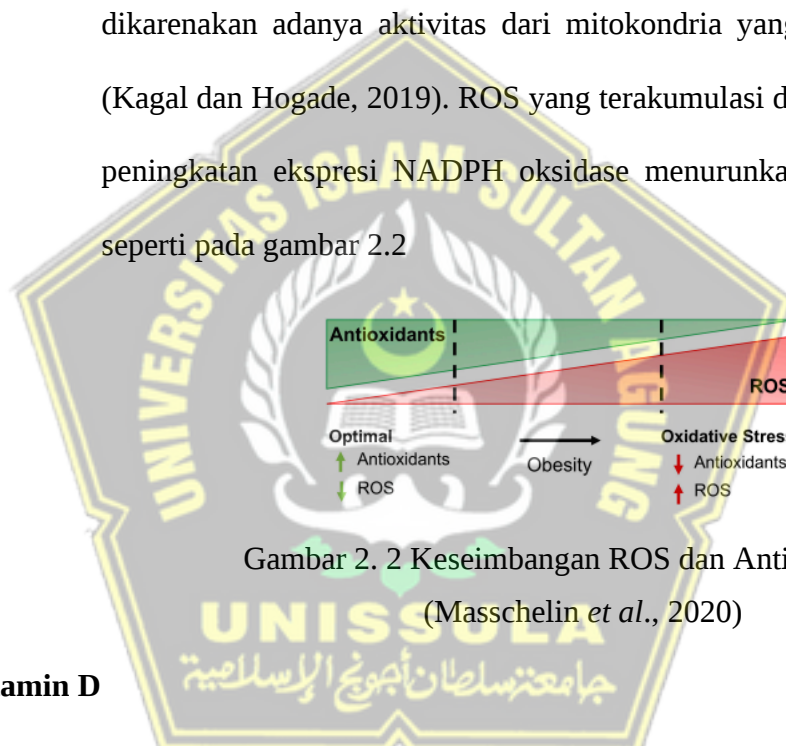
Saat puasa, khususnya 8-12 jam, kebutuhan energi akan dipenuhi oleh cadangan glikogen di hati dan otot. Sesudah itu masuk ke dalam periode puasa (starving) dan berkurang pasokan energi dan nutrisi penting yang dibutuhkan tubuh, yang menyebabkan perubahan proses metabolisme elemen utama tubuh. Kurangnya konsumsi glukosa menyebabkan proses glukoneogenesis, yang menyuplai otak dengan glukosa (Guyton et al, 2021).

Laju penggunaan glukosa berada di bawah kendali laju sekresi insulin dari pancreas. Glukosa darah dapat diketahui kadarnya dengan memeriksa glukosa darah Puasa. Pengukuran kadar glukosa darah puasa dapat dilakukan jika sebelumnya telah melakukan puasa (tidak makan dan minum kecuali air putih) selama 8 jam. Kadar gula darah ini mencerminkan kadar glukosa yang diproduksi oleh hati. Nilai di atas dari 126 mg/dL dikaitkan dengan diabetes. (WHO, 2022).

2.2.2 Efek Kadar Glukosa Darah Puasa

Peningkatan kadar glukosa darah bisa berasal dari konsumsi makanan atau minuman dengan merangsang pankreas untuk menghasilkan insulin sehingga mencegah kenaikan kadar glukosa darah yang lebih lanjut dan menyebabkan kadar glukosa darah menurun secara perlahan. Penyimpangan yang berlebihan dari nilai

normal, baik terlalu tinggi atau rendah menandakan terjadinya gangguan homeostasis. Kadar glukosa darah tinggi yang berkepanjangan memiliki korelasi erat dengan timbulnya obesitas. Konsumsi makanan yang menyebabkan kadar glukosa darah yang tinggi, menyebabkan kadar ROS selular lebih tinggi dan terjadinya sindroma metabolik (Tan, Norhaizan dan Liew, 2018), ini dikarenakan adanya aktivitas dari mitokondria yang lebih tinggi (Kagal dan Hogade, 2019). ROS yang terakumulasi disertai dengan peningkatan ekspresi NADPH oksidase menurunkan antioksidan seperti pada gambar 2.2



Gambar 2. 2 Keseimbangan ROS dan Antioksidan
(Masschelin *et al.*, 2020)

2.3 Vitamin D

Vitamin D adalah prohormon yang larut dalam lemak yang memainkan peran penting dalam metabolisme kalsium, fosfor dan mineral tulang. Sumber utama vitamin D adalah kolekalsiferol atau vitamin D₃, yang disintesis di kulit dari 7-dehydrocholesterol, dimana kolesterol adalah prekursornya (Raposo *et al.*, 2017). Sumber utama vitamin D bagi kebanyakan manusia adalah paparan kulit terhadap radiasi ultraviolet B (UVB; 290–315 nm) matahari. Vitamin D juga dapat diperoleh dari diet, tetapi sedikit makanan (terutama ikan

berminyak) yang secara alami mengandung vitamin D dan beberapa makanan seperti margarin dan susu, diperkaya dengan vitamin D. Setelah sintesis kulit atau penyerapan makanan, vitamin D, dalam bentuk tidak aktif, bersirkulasi terikat pada pengikatan vitamin D protein, yang mengangkutnya ke hati, di mana ia diubah oleh vitamin D -25-hidroksilase menjadi 25-hidroksivitamin D [25 (OH)D], bentuk sirkulasi utama vitamin D yang digunakan untuk menentukan status vitamin D (Migliaccio *et al*, 2019).

2.3.1 Metabolisme Vitamin D

Vitamin D₃ menjadi aktif secara biologis setelah hidroksilasi di hati oleh enzim sitokrom P450 2R1 (CYP2R1) dan sitokrom P450 27 (CYP27A1) menjadi 25(OH)D₃. Metabolit aktif penuh 1,25(OH)₂D₃ dihidroksilasi di ginjal oleh enzim sitokrom P450 27 B 1 (CYP27B1), parathormon (PTH), dan faktor pertumbuhan fibroblas 23 (FGF-23) mengontrol sintesis dan aktivitas CYP27B1 (Altieri *et al*, 2017). Sintesis 1,25(OH)₂D₃ diatur secara ketat dalam loop umpan balik negatif ginjal: tingkat tinggi 1,25(OH)₂D₃ dan FGF-23 menghambat CYP27B1 dan menginduksi sitokrom P450 24A1 (CYP24A1), yang mengubah 1,25(OH)₂D₃ menjadi bentuk tidak aktif 24(OH)D₃ (Anderson, 2017).

CYP27B1 diekspresikan oleh tipe sel lain, termasuk sel imun. Sel-sel ini menghasilkan 1,25(OH)₂D₃ yang memiliki efek autokrin dan/atau parakrin, tingkat tinggi yang diproduksi secara lokal dianggap bertanggung jawab untuk imunomodulasi. Regulasi sintesis

CYP27B1 dalam sel imun berbeda dengan sinyal yang mengatur produksi 1,25(OH)₂D₃ ginjal. Sinyal inflamasi, seperti lipopolisakarida (LPS) dan sitokin, menginduksi produksi monosit dan makrofag CYP27B1. Perbedaan regulasi produksi 1,25(OH)₂D₃ ini menunjukkan efek autokrin/parakrin sebagai imunomodulator. Aktivitas kalsifediol dan kalsitriol dapat dikurangi dengan hidroksilasi pada posisi 24 dari 24-hidroksilase vitamin D₃, menghasilkan pembentukan kalsiferol dan kalsitriol. Reseptor yang diaktifkan ini memasuki inti sel dan berikatan dengan elemen respons vitamin D (VDRE), sekuens DNA khusus gen. Transkripsi gen ini dirangsang dan menghasilkan tingkat protein yang lebih besar yang memediasi efek vitamin D (Bikle, 2014).

Beberapa reaksi sel terhadap kalsitriol tampaknya terlalu cepat untuk jalur transkripsi VDRE klasik, yang mengarah pada penemuan berbagai tindakan non-genomik vitamin D. PDIA3 yang terikat membran kemungkinan berfungsi sebagai reseptor alternatif dalam jalur ini (Morris *et al.*, 2015).

2.3.1 Efek Vitamin D pada tubuh

Konsentrasi vitamin D normal dalam darah harus sekitar 20 ng/dl. Kadar vitamin D yang rendah dalam tubuh dapat meningkatkan faktor risiko manusia untuk penyakit tidak menular seperti penyakit kardiovaskular, hipertensi, dislipidemia, intoleransi glukosa dan

diabetes, serta berhubungan dengan terjadinya penyakit autoimun (Ika, 2018).

Pada penelitian (Bischoff-Ferrari, 2014) kadar serum yang paling menguntungkan untuk 25(OH)D untuk semua hasil tampaknya mendekati 30 ng/mL (75 nmol/L), sedangkan tingkat vitamin D yang optimal menyimpulkan bahwa berkisar antara 30 sampai 40 ng/mL (75 sampai 100 nmol/L) yang direkomendasikan untuk atlet (Dahlquist et al., 2015). Vitamin D dapat mendukung aksi insulin dengan mengatur ekspresi reseptor, yang meningkatkan sensitivitas insulin dan mengatur keseimbangan level gula darah dengan memicu pelepasan insulin dari sel β pancreas melalui tingkat kalsium sel β pancreas yang diaspirasi (Valladares et al, 2019). Vitamin D mengaktifasi 1α hydroxylase yang diekspresikan dalam sel β pancreas. Vitamin D berfungsi dengan mengatur low resting levels dari komponen pensinyalan sel seperti Ca^{2+} dan spesies oksigen reaktif (ROS). Perannya dalam menjaga stabilitas fenotipik jalur pensinyalan ini tergantung pada kemampuan vitamin D untuk mengontrol ekspresi komponen-komponen yang bertindak untuk mengurangi kadar kedua Ca^{2+} dan ROS vitamin D dapat mengontrol ekspresi komponen toolkit yang bertanggung jawab untuk mempertahankan tingkat ROS dan Ca^{2+} yang rendah. Misalnya vitamin D merangsang ekspresi pompa dan penukar Ca^{2+} (PMCA) dan buffer Ca^{2+} seperti calbindin (CB) dan parvalbumin (Berridge, 2016).

2.4 Hubungan antara asap rokok, kadar glukosa darah puasa, dan vitamin D

Hubungan antara merokok dan kadar glukosa darah puasa yang tinggi diperantarai oleh kandungannya seperti nikotin dan CO. Jalur nikotin di sel chromaffin dapat meningkatkan kadar glukosa darah dengan mengikat reseptor nikotinik di ganglion di medulla adrenal, nikotin meningkatkan aliran adrenalin (epinefrin), hormone perangsang dan neurotransmitter. Pelepasan epinefrin (adrenalin) menyebabkan peningkatan denyut jantung, tekanan darah dan pernapasan, serta kadar glukosa darah yang tinggi (Elaine N, 2015). Peningkatan kadar Epinefrin dan Norepinefrin. Epinefrin bekerja sebagai faktor glikogenolisis di hati, menyebabkannya melepaskan glukosa yang banyak dalam waktu singkat (Guyton et al., 2021). Nikotin dapat mempengaruhi sekresi insulin melalui nAChR dalam sel β pankreas. nAChR diekspresikan oleh banyak tipe sel non-saraf yang berbeda, termasuk sel pulau pankreas, dimana nAChR yang terletak di ganglion pankreas memengaruhi sekresi insulin melalui mekanisme intraganglionik atau ganglionik endogen pankreas (Dwi Ario, 2014).

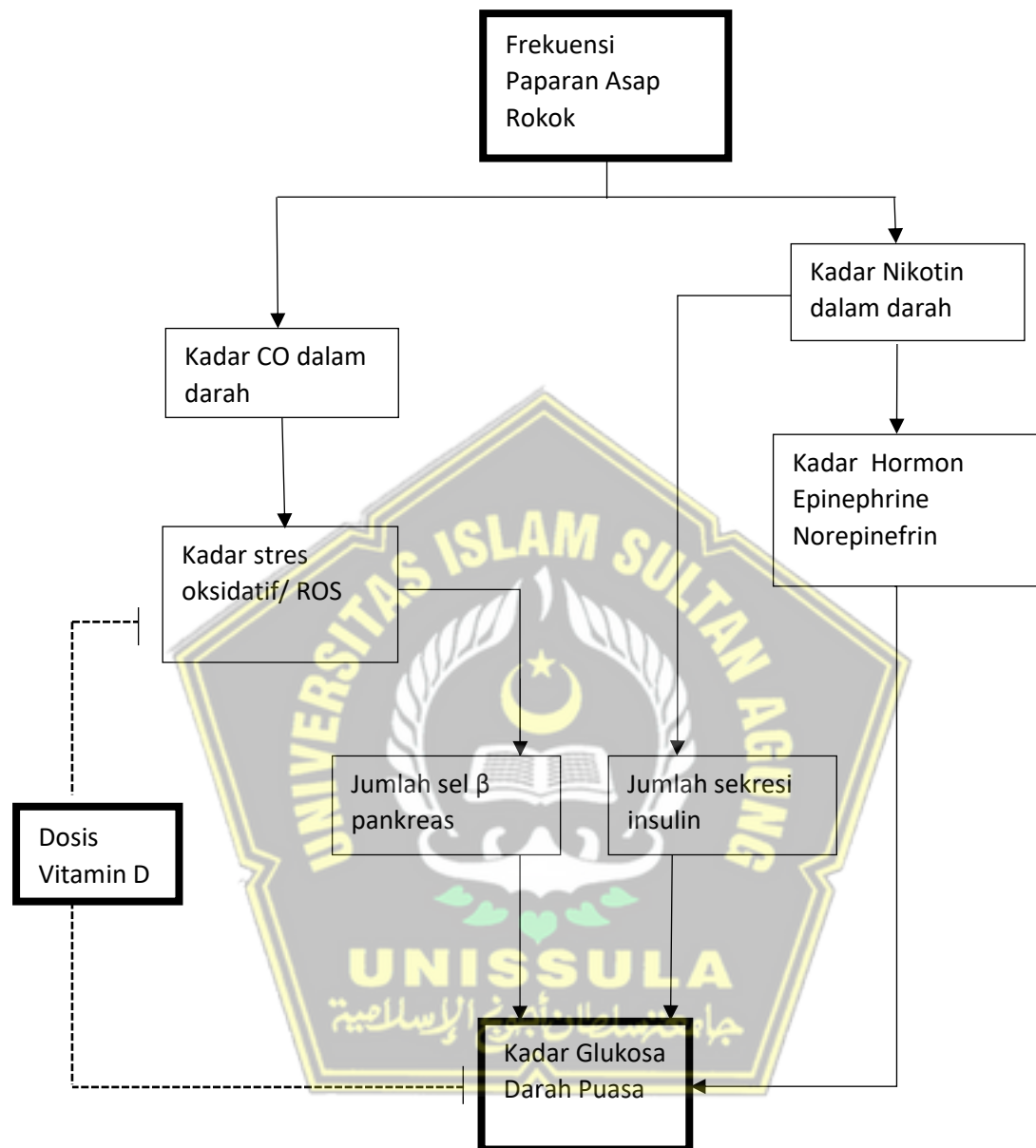
Paparan CO yang berlebihan dapat menyebabkan peningkatan ROS atau stres oksidatif dimana bertindak sebagai molekul kimia reaktif yang apabila dalam kadar tinggi dapat menyebabkan kerusakan sel, oksidasi lipid, protein dan DNA. CO juga berdampak pada transport seluler, mitokondria, iNOS, NADPH oxidase. CO yang dapat memicu perubahan fungsi seluler, yang dipromosikan di jalur napas terkait juga dengan kejadian stresor sebagai

akibat dari cedera, sehingga meningkatkan apoptosis, proliferasi, dan infiltrasi sel inflamasi sel β pankreas.

Vitamin D merangsang produksi insulin di sel β pankreas. Ketika ada cukup vitamin D, sel beta di pankreas cukup terstimulasi untuk memproduksi insulin yang cukup untuk memasukkan gula darah ke dalam sel. Apabila tubuh tidak cukup vitamin D dalam darah, maka kehilangan pula salah satu faktor perangsang pembentukan insulin di sel β pancreas (Hermawan D, 2016).



2.5 Kerangka Teori



Gambar 2. 3 Kerangka Teori

Keterangan :

: Tidak Diteliti

: Diteliti

→ : memicu

—| : menghambat

2.6 Kerangka Konsep



Gambar 2.4 Kerangka Konsep Penelitian

2.7 Hipotesis

Terdapat pengaruh frekuensi paparan asap rokok dan vitamin D terhadap kadar glukosa darah puasa pada tikus.



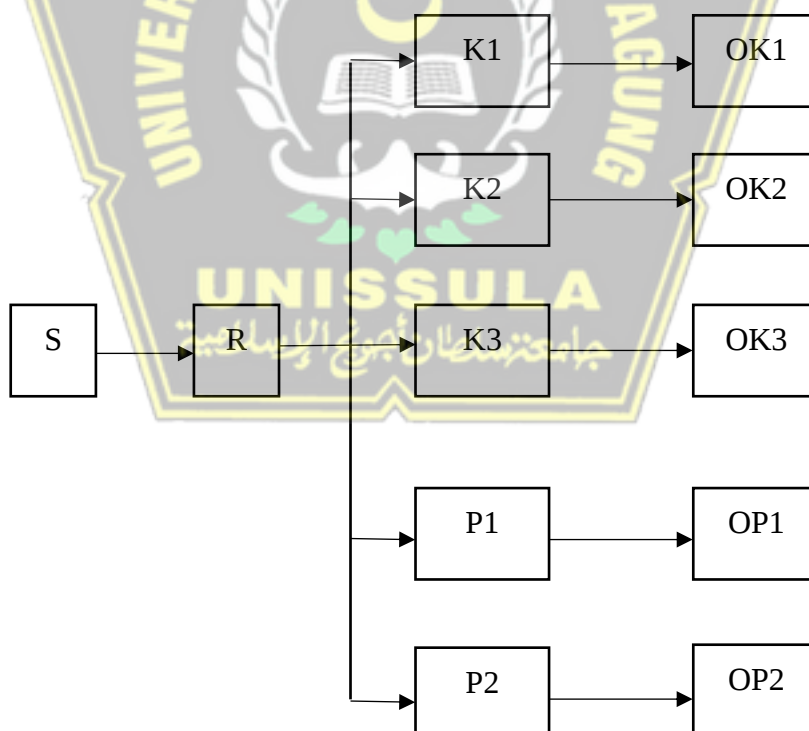
BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilaksanakan adalah penelitian eksperimental dengan rancangan penelitian *posttest only control group design*. Perlakuan yang diberikan adalah pemberian paparan asap rokok dan pemberian vitamin D pada tikus *Rattus Norvegicus*, dimana keluarannya berupa kadar glukosa darah puasa.

Penelitian secara skematis dapat digambarkan seperti ini :



Keterangan :

- S = Sampel berupa tikus putih *Rattus Norvegicus*
- R = Randomisasi
- K1 = Kelompok kontrol paparan asap rokok dengan frekuensi 2 kali dengan 4 batang rokok/hari
- K2 = Kelompok kontrol paparan asap rokok dengan frekuensi 1 kali dengan 8 batang rokok/hari
- K3 = Kelompok kontrol tanpa asap rokok + Vitamin D 0,2µgr/dL/ekor
- P1 = Perlakuan kelompok paparan asap rokok dengan frekuensi 1 kali dengan 8 batang rokok/hari + Vitamin D 0,2µgr/dL/ekor
- P2 = Perlakuan kelompok paparan asap rokok dengan frekuensi 2 kali dengan 4 batang rokok/hari + Vitamin D 0,2µgr/dL/ekor
- OK1 = Observasi kadar glukosa darah puasa kelompok K1
- OK2 = Observasi kadar glukosa darah puasa kelompok K2
- OK3 = Observasi kadar glukosa darah puasa kelompok K3
- OP1 = Observasi kadar glukosa darah puasa kelompok P2
- OP2 = Observasi kadar glukosa darah puasa kelompok P3

3.2 Variabel dan Definisi Operasional

3.2.1 Variabel Penelitian

3.2.1.1 Variabel Bebas :frekuensi paparn asap rokok,
vitamin D

3.2.1.2 Variabel Terikat : kadar glukosa darah puasa

3.2.2 Definisi Operasional

3.2.2.1 Frekuensi paparan asap rokok

Frekuensi paparan asap rokok ditentukan oleh jumlah dan waktu pemberian asap rokok pada tikus *Rattus norvegicus* yang sengaja dikandangkan dalam kandang tikus berlubang. Paparan asap rokok terjadi dua hari sekali setiap pagi dengan frekuensi paparan yang berbeda yaitu 8 batang sehari sekali, 4 batang 2 kali sehari) dari hari ke 7 sampai hari ke-14.

Skala: rasio

3.2.2.2 Kadar glukosa darah puasa

Diperoleh perhitungan kadar glukosa darah puasa dengan alat spektrofotometer menggunakan metode glukosa oksidase (GOD-PAP) yang diperoleh dari sampel darah yang diambil pada hari ke 21 dari tikus *Rattus Norvegicus* dimana jumlah kandungan glukosa dalam serum darah tikus yang diambil setelah tikus dipuasakan selama 6-8 jam dan dinyatakan dalam ukuran mg/dl.

Skala: rasio

3.2.2.3 Vitamin D

Vitamin D diperoleh dari suplemen Vitamin D yang sudah dilarutkan dan diberikan masing-masing kepada kelompok perlakuan dengan dosis 0,2µgr/dL/ekor

Skala : rasio

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi Penelitian

Penelitian ini menggunakan 5 tikus *Rattus Novergicus* tiap grup, sehingga berdasarkan jumlah keseluruhan sampel yaitu 25 ekor tikus *Rattus Novergicus*.

3.3.2 Sampel Penelitian

3.3.2.1 Kriteria inklusi

- Tikus jantan spesies *Rattus Norvegicus*
- 180 gram berat badan tikus
- Usia tikus 4 bulan
- Sudah diaptasi 7 hari

3.3.2.2 Kriteria eksklusi

- Tikus yang tidak aktif bergerak

3.3.2.3 Kriteria dropout

- Tikus mati saat adaptasi maupun penelitian

3.4 Instrumen dan Bahan Penelitian

3.4.1 Instrumen Penelitian

Kandang tikus individu, sonde lambung, timbangan, mesin sentrifugasi, mesin penghisap rokok kandang, tabung reaksi rak tabung Disposable Syringes, spektrofotometer, mikrohematokrit, mikropipet, kuvet, waterbath.

3.4.2 Bahan Penelitian

- a. Tikus Jantan
- b. Ransum pakan standar
- c. Akuades
- d. Rokok kretek merk *Dji Sam Soe*
- e. Botol sirup vitamin D merk D-VIT

3.5 Cara Penelitian

3.5.1 Persiapan Penelitian

Persiapan dimulai dengan subjek penelitian yaitu 25 ekor tikus *Rattus Novergicus* usia 4 bulan dengan berat badan 180 gram. Subjek dikelompokkan berisi 5 tikus per kelompok secara random dan diaklimatisasi selama 7 hari yaitu hari ke 0 hingga hari ke 7 penelitian dengan diberi pakan standar.

3.5.2 Pembuatan Suplemen Vitamin D

Pemberian Vitamin D dilakukan setiap jam 16.00 WIB, setiap hari pada minggu ke-2 bersamaan dengan pemberian paparan asap rokok. Dosis Vitamin D diberikan sebanyak 0,2µgr/dL/ekor dengan

menggunakan spluit 1 cc. karena vitamin D merupakan vitamin larut lemak maka harus diencerkan dengan minyak zaitun. Pemberian Vitamin D dihantarkan secara oral pada tikus melalui tabung oral. Tabung oral dilekatkan pada atas langit mulut tikus kemudian perlahan-lahan dimasukkan ke dalam kerongkongan dan cairan vitamin D diinjeksi ke dalam. Dosis Vitamin D yang lazim pada manusia adalah 500-600 mg, dosis ini perlu dikonversi untuk diberikan ke hewan uji. Namun pada penelitian ini, pemberian dosis vitamin D merujuk pada penelitian sebelumnya yaitu 0,2 µgr/dL/ekor.

3.5.3 Pelaksanaan Penelitian

Tikus yang dipapar asap rokok akan diberikan kandang untuk penelitian yang terbuat dari besi dengan 120 cm panjangnya, 70 cm lebarnya, dan 60 cm tingginya atau dengan 8.400 cm² luasnya yang nantinya dibedakan menjadi kandang dengan pengasapan dan kandang tanpa pengasapan. Pada bagian tengah kandang diletakkan kotak kaleng yang diberi lubang 2 cm agar asap rokok yang ada didalam kotak keluar melalui lubang tersebut. Alas kandang berupa serutan kayu. Pengasapan dilakukan dari hari ke 7 hingga hari ke 14 dengan cara memberikan rokok setiap dua hari sekali yaitu hari minggu, selasa, Kamis dan seterusnya. Pengikatan batang rokok dilakukan pada jam 10.00 dan 14.00 dengan jumlah batang rokok yaitu tidak pengasapan rokok, 8 batang x1/hari, 4 batang x2/hari dengan durasi masing-masing 30 menit. Batang rokok dimasukkan

kedalam kandang tikus yang sudah memiliki lubang sebagai tempat rokok. Sedangkan pada kandang tanpa pengasapan akan diletakkan pada lokasi yang berbeda.

3.5.4 Pengambilan Sampel Darah

Pengambilan sampel darah dilakukan setelah tikus dipuasakan selama 8 jam dengan cara mempersiapkan mikrohematokrit dan tabung penampung darah, setelah itu mikrohematokrit ditusukkan pada sinus orbitalis dan memutar mikrohematokrit tersebut sampai darah keluar. vena pada tikus. Masukkan sampel darah ke venoject plain ukuran 5 mL.

3.5.5 Melakukan Pemeriksaan Kadar Glukosa Darah

Pengukuran kadar glukosa darah diukur dengan pemeriksaan laboratorium menggunakan metode GOD-PAP (*glucose oxidase-peroxidase*). Prinsip kerja metode GOD-PAP adalah glukosa oksidase membentuk asam glukonat dan hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida yang terbentuk bereaksi dengan phenol dan 4-amino phenazone dengan bantuan enzim peroksidase menghasilkan quinoneimine yang berwarna merah muda dan dapat diukur dengan fotometer pada panjang gelombang 546 nm. Intensitas warna yang terbentuk setara dengan kadar glukosa darah yang terdapat dalam sampel. Pemeriksaan kadar glukosa darah dilakukan dengan cara mencampurkan 10 μ L serum dengan 1 ml reagen glukosa oksidase kit selanjutnya diperiksa dengan alat spektrofotometer.

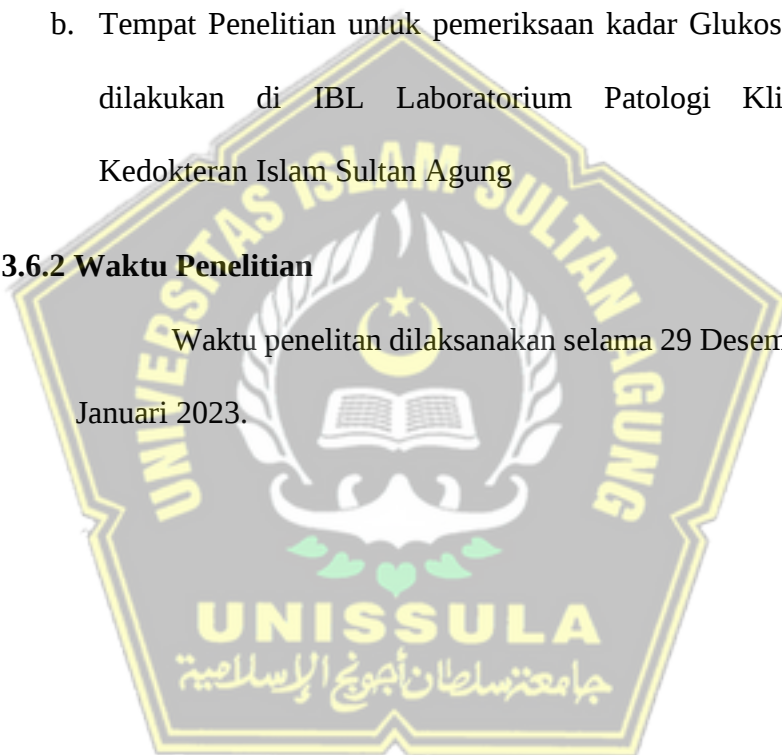
3.6 Tempat dan Waktu

3.6.1 Tempat Penelitian

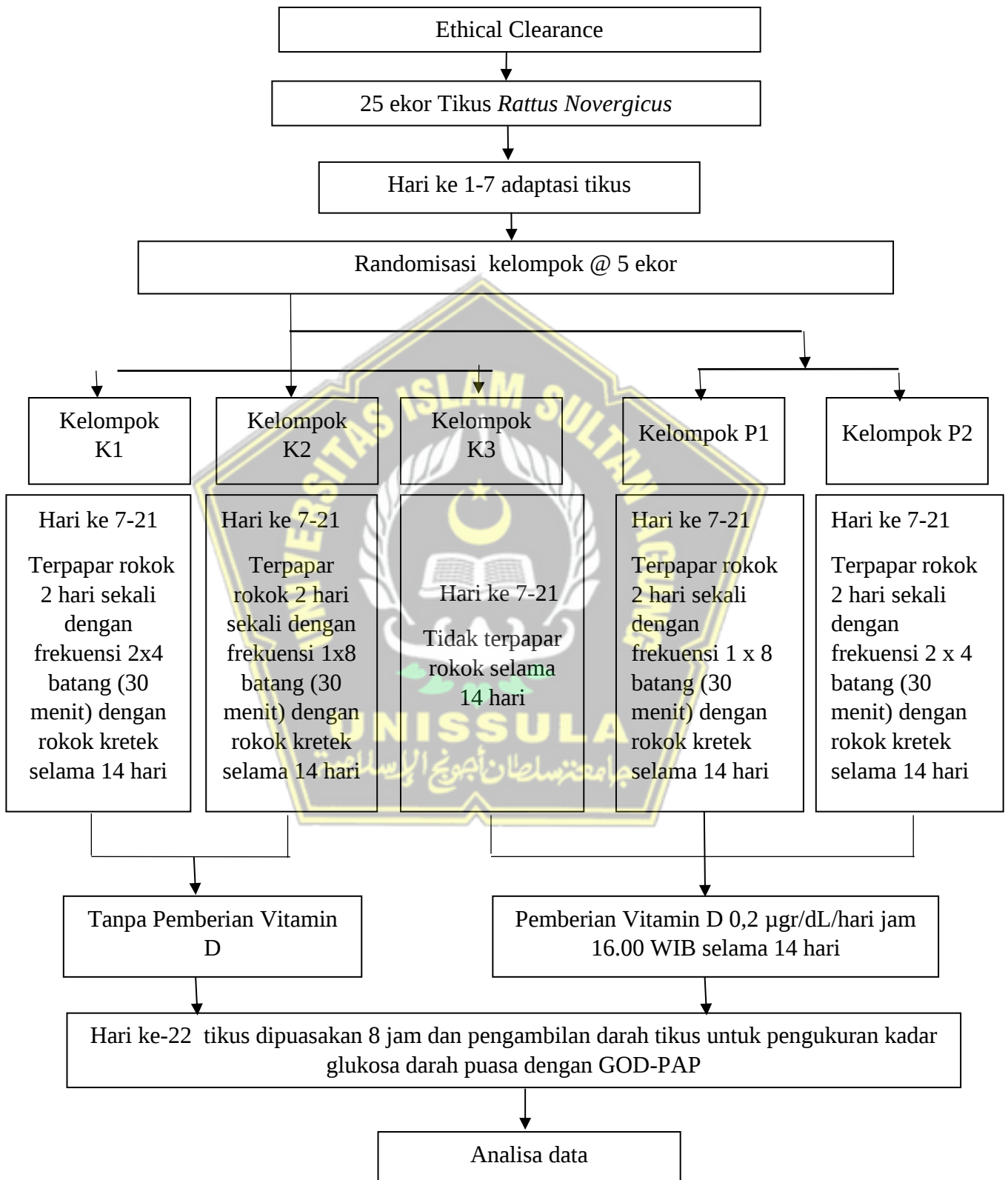
- a. Tempat penelitian untuk pemberian paparan asap rokok dan Vitamin D pada tikus dilakukan di *Integrated Biomedical Laboratory* (IBL), Laboratorium Hewan Fakultas Kedokteran Islam Sultan Agung Semarang.
- b. Tempat Penelitian untuk pemeriksaan kadar Glukosa darah puasa dilakukan di IBL Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Islam Sultan Agung

3.6.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan selama 29 Desember 2022 – 21 Januari 2023.



3.7 Alur Kerja Penelitian



Gambar 3.2 Alur Penelitian

3.8 Analisis Data

Data yang didapatkan berupa kadar glukosa darah puasa dalam satuan mg/dl yang diperoleh menggunakan metode *glucose oxidase-peroxidase* (GOD-PAP), setelah itu dilakukan analisis statistik. Data hasil pengukuran dianalisis statistik menggunakan SPSS software Ver. 25.0 for Windows. Dikarenakan jumlah sampel <30 , maka data kadar glukosa darah puasa diuji normalitasnya menggunakan *Shapiro Wilk*. dan diuji homogenitasnya menggunakan *Levene's Test*. Data dinyatakan terdistribusi normal dan homogen apabila hasil uji *Shapiro Wilk* dan *Levene's Test* mendapatkan hasil $p > 0,05$. Jika nilai $p > 0,05$, maka H_0 diterima ; H_1 ditolak. Jika nilai $p < 0,05$, maka H_0 ditolak ; H_1 diterima

Data terdistribusi normal dan data homogen maka dilanjutkan uji one way ANOVA, kemudian dapat dilanjutkan uji *Post Hoc LSD*. Untuk data dengan distribusi tidak normal dan variasi data tidak homogen dilakukan uji statistik non parametrik *Kruskal-Wallis*, jika hasil uji statistik menunjukkan perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan uji statistik *Mann-Whitney*. Bilamana data berdistribusi normal tetapi tidak homogen, data masih dapat diuji dengan menggunakan ANOVA satu arah yang dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tamhane's*.

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengenali pengaruh frekuensi asap rokok dan vitamin D terhadap kadar glukosa darah puasa pada tikus. Percobaan dilakukan pada tikus *Rattus Norvegicus* dengan jumlah sampel sebanyak 25 ekor yang dibagi dalam 5 kelompok selama 21 hari. Vitamin D yang didapatkan menggunakan produk *D-VIT* yang diproduksi oleh PT. GRACIA PHARMINDO dan dikemas dalam botol sirup. Penelitian ini bertujuan untuk mengenali pengaruh frekuensi asap rokok terhadap kadar glukosa darah puasa pada tikus yang diberi vitamin D.

Kelompok 1 (K1) dan Kelompok 2 (K2) sebagai kontrol negatif dengan paparan asap rokok dengan frekuensi masing-masing 2x4 dan 1x8 tanpa diberi vitamin D, sedangkan kelompok 3 (K3) sebagai kontrol positif dengan tidak dipapar rokok dan diberi vitamin D, kelompok perlakuan 1 (P1) dan kelompok perlakuan 2 (P2) dengan paparan asap rokok dengan frekuensi masing-masing 2x4 dan 1x8 dengan pemberian vitamin D.

4.1.1 Deskriptif data

Dilakukan pengelolaan data rerata jumlah Kadar Glukosa Darah Puasa pada masing-masing kelompok didapat hasil seperti pada tabel dan grafik dibawah ini :

Tabel 4.1. Hasil Rerata Kadar Glukosa Darah Puasa (mg/dL)

	Rerata $\pm$ SD	Median
K1	32.56 $\pm$ 10.13	30.96
K2	26.09 $\pm$ 2.68	25.80
K3	13.08 $\pm$ 2.91	14.33
P1	20.05 $\pm$ 4.26	20.18
P2	22.85 $\pm$ 6.96	23.03

Keterangan : K1 : paparan asap rokok dengan frekuensi 2x4 batang tanpa pemberian vitamin D. K2 : paparan asap rokok dengan frekuensi 1x8 batang tanpa pemberian vitamin D. K3 : tidak dipapar asap rokok dan diberi vitamin D. P1 : paparan asap rokok dengan frekuensi 1x8 batang dan pemberian vitamin D. P2 : paparan asap rokok dengan frekuensi 2x4 batang dan pemberian vitamin D



Dari grafik diatas tertera perbedaan rerata kadar glukosa darah puasa antar kelompok K1 dan K2. K1 dengan frekuensi paparan asap rokok 2x tanpa pemberian vitamin D mempunyai lebih tinggi jumlah rerata kadar glukosa darah puasa sebesar 32.56 mg/dl, dibanding K2 dengan frekuensi paparan asap rokok 1x sebesar 26.05 mg/dl. Hal yang sama terjadi pada kelompok P2 dengan frekuensi paparan asap rokok 2x dengan pemberian vitamin

D mempunyai jumlah kadar glukosa darah puasa yang lebih tinggi sebesar 22.85 mg/dl, dibanding P1 dengan frekuensi 1x dengan pemberian vitamin D sebesar 20.05 mg/dl. Pada kontrol K3 yang tidak diberi dan diberikan vitamin D didapatkan kadar glukosa darah puasa terendah yaitu 14.3 mg/dl.

4.1.2 Distribusi Data

Data jumlah Kadar Glukosa Darah Puasa yang didapatkan diuji normalitasnya dengan *Shapiro-Wilk*. Hasilnya bisa terlihat dalam tabel berikut:

Tabel 4.2. Hasil Uji Normalitas Jumlah Kadar Glukosa Darah Puasa

			Uji Normalitas
			Nilai <i>P</i>
Kadar Glukosa Darah Puasa	K1		0,356*
	K2		0,268*
	K3		0,162*
	P1		0,713*
	P2		0,161*

Keterangan : * = $p > 0,05$

Tabel diatas menunjukkan bahwa jumlah Kadar Glukosa Darah Puasa pada semua kelompok memiliki signifikasi nilai $P > 0,05$. Sehingga dapat diambil kesimpulan bahwa data jumlah Kadar Glukosa Darah Puasa berdistribusi normal. Kemudian dilanjutkan dengan uji homogenitas *Levene's test*. Hasil uji homogenitas jumlah Kadar Glukosa Darah Puasa ditampilkan dalam tabel berikut.

Tabel 4.3. Hasil uji Homogenitas Jumlah Kadar Glukosa Darah Puasa

		Uji Homogenitas	
		Kelompok	Nilai P
Kadar Glukosa Darah Puasa		K1	0,003
		K2	
		K3	
		P1	
		P2	

Berdasarkan tabel tersebut dapat dilihat bahwa data jumlah Kadar Glukosa Darah Puasa semua kelompok tidak homogen dikarenakan signifikan nilai p tidak mencapai $P > 0,05$. Dari analisis *Shapiro-Wilk* dan *Levene's Test* menandakan data terdistribusi normal tetapi tidak homogen, maka data tetap dapat diuji dengan *one way ANOVA*, kemudian dilanjutkan dengan *Post Hoc Tamhane's*.

4.1.3 Analisis Multivariat

Data menguji *One Way Anova* dan diteruskan menggunakan *Post Hoc Tamhane's* menunjukkan hasil sebagai berikut:

Tabel 4.4. Hasil Uji One Way Anova

Kelompok	Nilai P
K1	0,000*
K2	
K3	
P1	
P2	

Keterangan : * = $p < 0,05$

Berdasarkan melalui pengujian *One Way Anova* diperoleh hasilnya terdapat perbedaan kadar glukosa darah puasa yang signifikan antar kelompok sampel yang diamati melalui nilai p ($0,000 < 0,05$), dan dapat dilanjutkan dengan pengujian *Post Hoc Tamhanes* untuk

menentukan perbedaan antar kelompok. Berikut tabel hasil uji *Post Hoc*

Tamhane's :

Tabel 4.5. Hasil Uji *Post Hoc* Tamhane's

kelompok	Kelompok pembanding	P
K1	K2	0,108
	K3	0,000*
	P1	0,007*
	P2	0,030*
K2	K1	0,108
	K3	0,001*
	P1	0,000*
	P2	0,016*
K3	K1	0,000*
	K2	0,001*
	P1	0,015*
	P2	0,007*
P1	K1	0,007*
	K2	0,000*
	K3	0,015*
	P2	0,040*
P2	K1	0,030*
	K2	0,016*
	K3	0,007*
	P1	0,040*

Keterangan : * = $p < 0,05$

Berdasarkan data hasil pengujian *Post Hoc* Tamhane's, terdapat perbedaan nilai p ($p < 0,05$) yang signifikan antar semua kelompok kecuali K1 dan K2.

4.2 Pembahasan

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental menggunakan *post-test only control group design* untuk mengetahui pengaruh frekuensi paparan asap rokok terhadap kadar glukosa darah puasa pada tikus *Rattus Norvegicus* yang diberi vitamin D. Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan nilai p yang signifikan di hampir semua kelompok kecuali K1 dengan K2. Pada kelompok

P1 dan P2 dibandingkan K1 dan K2 mengalami penurunan kadar glukosa darah puasa pada kelompok P1 dan P2. Hal ini mengesankan pemberian vitamin D memberikan efek terhadap penurunan kadar glukosa darah puasa pada tikus. Penelitian Lolita (2020) menyebutkan hal yang sejalan bahwa terjadi penurunan kadar glukosa darah puasa yang diberi vitamin D dengan dosis yang sama pada kelompok yang tidak diberikan asap rokok dan yang diberikan paparan asap rokok.. Vitamin D dapat memacu pembentukan dan kepekaan insulin sehingga menyebabkan penurunan kadar glukosa darah puasa (Pusparini, 2018). Vitamin D memacu sel beta pankreas memproduksi cukup insulin, sehingga gula darah dapat dimasukkan ke dalam sel (Hermawan D, 2016). Vitamin D juga meningkatkan ambilan kadar glukosa di perifer. Mekanisme lain yang terjadi adalah peningkatan kadar kalsium intraseluler dari pemberian Vitamin D akan meningkatkan pengikatan kalmodulin ke substrat reseptor insulin-1 (IRS-1), yang mengganggu fosforilasi tirosin yang distimulasi insulin dan aktivasi PI3-kinase (Ashraf dan Alvarez, 2010). Namun pada penelitian Lolita (2020) tidak memantau dari kadar kalsium yang berhubungan dengan peningkatan kadar kalsium.

Pada penelitian ini kelompok K3 dibandingkan dengan P1 dan P2 terdapat perbedaan yang signifikan dilihat dari kadar glukosa yang meningkat pada kelompok P2 dan P1. Merokok menyebabkan oksidatif stress akibat peningkatan ROS, sehingga sel β pankreas pada pulau pankreas sangat rentan terhadap kerusakan yang disebabkan oleh ROS disertai dengan kurangnya enzim antioksidan dalam sel. ROS akan menginduksi aktivasi Poly-

ADPRibose-Polymerase (PARP) yang menyebabkan NAD penipisan. Hal ini akan mengakibatkan apoptosis sel penghasil insulin (M. I. Sari et al., 2018). Perannya dalam menjaga stabilitas fenotipik jalur pensinyalan ini tergantung pada kemampuan vitamin D untuk mengontrol ekspresi komponen-komponen yang bertindak untuk mengurangi kadar kedua Ca^{2+} dan ROS vitamin D dapat mengontrol ekspresi komponen *toolkit* yang bertanggung jawab untuk mempertahankan tingkat ROS dan Ca^{2+} yang rendah (Berridge, 2016). Hal ini sejalan dengan penelitian Sari (2018) yang menyebutkan bahwa asap rokok memengaruhi dari perkembangan resistensi insulin yang berhubungan dengan sel β pankreas. Namun pada penelitian ini tidak memantau dari kadar ROS dan jumlah sel β pankreas yang mengalami apoptosis.

Pada kelompok P1 dengan P2 didapatkan perbedaan nilai p yang signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa frekuensi paparan asap rokok dapat mempengaruhi penurunan kadar glukosa darah puasa pada kelompok yang diberi vitamin D. P1 adalah kelompok perlakuan dimana diberi paparan asap rokok dengan frekuensi 1 kali sehari sebanyak 8 batang dimana terdapat jeda waktu 48 jam, sedangkan P2 dengan frekuensi 2 kali sehari sebanyak masing-masing 4 batang yang dimana terdapat jeda waktu sekitar 4 jam dan 44 jam perlakuan setelahnya. Hal ini juga dapat dijelaskan melalui frekuensi yang diberikan yang menyebabkan perbaikan pada frekuensi P1 memberikan lebih lama jeda waktu dibanding P2 sehingga waktu untuk sel pulih dari peningkatan aktivitas radikal bebas dan nikotin dari asap rokok yang dimana penelitian Dwi Ario (2014) menyebutkan bahwa 1 jam akut dan 48 jam kronik paparan rokok

menghambat pelepasan insulin. Hal ini juga sejalan dengan penelitian Inayatillah et al. (2014) yang menyebutkan bahwa terdapat korelasi yang bermakna antara frekuensi jumlah rokok perhari dengan dalam waktu 6 bulan terakhir yang diukur dengan kadar CO ekspirasi menggunakan CO *analyzer*. Frekuensi paparan yang lebih tinggi meningkatkan kadar CO ekspirasi yang dipromosikan di jalur napas yang berdampak pada transport seluler, mitokondria, iNOS, NADPH oxidase dimana paparan pada jangka waktu yang lama dapat meningkatkan stres oksidatif. Stres oksidatif penghambatan rapamycin (mTOR), dan c-Jun N-terminal kinase (JNK) aktivasi di sel β pankreas menurunkan sekresi insulin dan proliferasi sel β pancreas (Eguchi et al., 2021).

Pada kelompok K1 dengan K2 tidak terdapat perbedaan yang signifikan dimana kedua kelompok tersebut tidak diberi vitamin D sehingga terjadi peningkatan kadar glukosa darah puasa dibanding kelompok perlakuan yang diberi vitamin D. Hal ini diduga karena jumlah batang rokok yang dipapar sama antar kedua kelompok dan tidak terlalu mengacu pada frekuensi paparan yang diberikan. Perbedaan frekuensi merokok yang diberikan kurang memberikan jeda waktu untuk membuat perbaikan sel dari peningkatan radikal bebas pada kelompok yang frekuensi paparannya lebih sedikit, walaupun ada perbedaan pada rerata kadar glukosa darah puasa antar kedua kelompok dimana lebih rendah pada K2 dibandingkan K1 . Paparan asap rokok yang berlangsung dalam sehari dapat memperburuk resistensi insulin yang disebabkan oleh bahan kimia aktif yaitu nikotin yang menyebabkan penurunan sekresi insulin karena

aktivasi hormon *katekolamin*, efek negative untuk aksi insulin dan mengganggu fungsi sel β pancreas. Nikotin mempengaruhi sekresi insulin melalui nAChR dalam sel β pancreas yang diatur dengan mekanisme ganglion endogen pankreas (Dwi Ario, 2014).



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Terdapat pengaruh frekuensi paparan asap rokok dan vitamin D terhadap glukosa darah puasa pada tikus *Rattus Norvegicus* yang diberi vitamin D
2. Rerata kadar glukosa darah puasa pada tikus *Rattus Norvegicus* :
 - a. Terpapar asap rokok dengan frekuensi 2x4 dan tidak diberi vitamin D sebesar **$32,56 \pm 10,13$ mg/dL**
 - b. Terpapar asap rokok dengan frekuensi 1x8 dan tidak diberi vitamin D sebesar **$26,09 \pm 2,68$ mg/dL**
 - c. Tidak terpapar asap rokok dan diberi vitamin D sebesar **$13,08 \pm 2,91$ mg/dL**
 - d. paparan asap rokok dengan frekuensi 1x8 dengan pemberian vitamin D sebesar **$20,05 \pm 4,26$ mg/dL**
 - e. paparan asap rokok dengan frekuensi 2x4 dengan pemberian vitamin D sebesar **$22,85 \pm 6,96$ mg/dL**

5.2 Saran

Masyarakat dengan hiperglikemia atau diabetes melitus akibat stress oksidatif paparan asap rokok dapat mengkonsumsi vitamin D sebagai salah satu terapi komplementer untuk mempertahankan kadar glukosa darah.

Pada penelitian ini juga mempunyai keterbatasan yang dapat menjadi saran dalam melakukan penelitian selanjutnya yaitu:

1. Dilakukan penelitian yang sama untuk melihat jumlah sel β pancreas
2. Dilakukan penelitian yang sama untuk melihat kadar kalsium
3. Dilakukan penelitian yang sama untuk melihat kadar ROS



DAFTAR PUSTAKA

- A. Sacher, R. (2012). *Tinjauan Klinis Hasil Pemeriksaan Lab. EGC*. http://ucs.sulselib.net//index.php?p=show_detail&id=67011
- Altieri, B., Muscogiuri, G., Barrea, L., Mathieu, C., Vallone, C. V, Mascitelli, L., Bizzaro, G., Altieri, V. M., Tirabassi, G., Balercia, G., Savastano, S., Bizzaro, N., Ronchi, C. L., Colao, A., Pontecorvi, A., dan Della Casa, S. (2017). Does vitamin D play a role in autoimmune endocrine disorders? A proof of concept. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 18(3), 335–346. <https://doi.org/10.1007/s11154-016-9405-9>
- Anderson, P. H. (2017). Vitamin D Activity and Metabolism in Bone. *Current Osteoporosis Reports*, 15(5), 443–449. <https://doi.org/10.1007/s11914-017-0394-8>
- Ashraf, A., dan Alvarez, J. A. (2010). Role of vitamin D in insulin secretion and insulin sensitivity for glucose homeostasis. *International Journal of Endocrinology*, 2010(March 2009). <https://doi.org/10.1155/2010/351385>
- Bajaj, M. (2012). Nicotine and insulin resistance: when the smoke clears. *Diabetes*, 61(12), 3078–3080. <https://doi.org/10.2337/db12-1100>
- Berridge, M. J. (2016). Vitamin D, reactive oxygen species and calcium signalling in ageing and disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1700). <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0434>
- Bikle, D. D. (2014). Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chemistry dan Biology*, 21(3), 319–329. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.12.016>
- Bischoff-Ferrari, H. A. (2014). Optimal serum 25-hydroxyvitamin D levels for multiple health outcomes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 810, 500–525. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0437-2_28
- Boukhenouna, S., Wilson, M. A., Bahmed, K., dan Kosmider, B. (2018). Reactive oxygen species in chronic obstructive pulmonary disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5730395>
- Dahlquist, D. T., Dieter, B. P., dan Koehle, M. S. (2015). Plausible ergogenic effects of vitamin D on athletic performance and recovery. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 12, 33. <https://doi.org/10.1186/s12970-015-0093-8>
- Dwi Ario, M. (2014). Effect of Nicotine in Cigarette for Type 2 Diabetes Mellitus. *J Majority*, 3(7), 75–80.
- Eguchi, N., Vaziri, N. D., Dafoe, D. C., dan Ichii, H. (2021). The role of oxidative stress in pancreatic β cell dysfunction in diabetes. *International Journal of*

- Molecular Sciences*, 22(4), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms22041509>
- Elaine N, M. (2015). No Title. In E. N. Marieb (Ed.), *Monograph* (11th ed.). Pearson.
- Gausserès, B., Liu, J., Foppen, E., Tourrel-Cuzin, C., Sanchez-Archidona, A. R., Delangre, E., Cruciani-Guglielmacci, C., Pons, S., Maskos, U., Thorens, B., Magnan, C., Movassat, J., dan Maouche, K. (2020). The constitutive lack of $\alpha 7$ nicotinic receptor leads to metabolic disorders in mouse. *Biomolecules*, 10(7), 1–28. <https://doi.org/10.3390/biom10071057>
- Guyton, A. C., Hall, J. E., dan Hall, M. E. (2021). *Textbook of medical physiology* (14th ed.). Philadelphia, PA : Elsevier.
- Hilawe, E. H., Yatsuya, H., Li, Y., Uemura, M., Wang, C., Chiang, C., Toyoshima, H., Tamakoshi, K., Zhang, Y., Kawazoe, N., dan Aoyama, A. (2015). Smoking and diabetes: Is the association mediated by adiponectin, leptin, or C-reactive protein? *Journal of Epidemiology*, 25(2), 99–109. <https://doi.org/10.2188/jea.JE20140055>
- Ika. (2018). Anak Indonesia Hadapi Ancaman Kekurangan Vitamin D. *Universitas Gadjah Mada*, May.
- Inayatillah, I. R., Syahrudin, E., dan Susanto, A. D. (2014). Kadar Karbon Monoksida Udara Ekspirasi pada Perokok dan Bukan Perokok serta Faktor-Faktor yang Mempengaruhi. *Jurnal Respirologi Indonesia*, 34(4), 180–190. <http://jurnalrespirologi.org/wp-content/uploads/2015/08/JRI-Oct-2014-34-4-180-90.pdf>
- Joseph, V. (2016). Efek akut merokok kretek terhadap fungsi ventrikel kanan. *Jurnal Biomedik (Jbm)*, 8(2). <https://doi.org/10.35790/jbm.8.2.2016.12698>
- Kagal, U. A., dan Hogade, A. P. (2019). Effect of high carbohydrate diet on complete Freund's adjuvant induced inflammation in rats. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 12(3), 1457–1462. <https://doi.org/10.13005/bpj/1775>
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. (2020). Hari tanpa tembakau sedunia 2020. *World Health Organization*, 4, 1–4. <https://www.dw.com/id/who-merokok-sebabkan-jutaan-kasus-serangan-jantung/a-43995635>
- Lolita Putri Nanda Utami, Rusmini, H., Nurmallasari, Y., dan Hermawan, D. (2020). Pengaruh Vitamin D3 Terhadap Glukosa Darah Tikus Wistar Yang Dipapar Asap Rokok. *ARTERI: Jurnal Ilmu Kesehatan*, 1(2), 130–138. <https://doi.org/10.37148/arteri.v1i2.52>
- Mahabee-Gittens, E. M., Quintana, P. J. E., Hoh, E., Merianos, A. L., Stone, L., Lopez-Galvez, N., dan Matt, G. E. (2021). Collecting Hand Wipe Samples to Assess Thirdhand Smoke Exposure. *Frontiers in Public Health*, 9(December), 1–4. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.770505>
- Mangimbulude, J. C., dan Karwur, F. F. (2013). Merokok dan Oksidasi DNA | Fitria

- | Sains Medika. *Sains Medika*, 5, 113–120.
<http://jurnal.unissula.ac.id/index.php/sainsmedika/article/view/352/291>
- Masschelin, P. M., Cox, A. R., Chernis, N., dan Hartig, S. M. (2020). The Impact of Oxidative Stress on Adipose Tissue Energy Balance. *Frontiers in Physiology*, 10(January), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01638>
- Matough, F. A., Budin, S. B., Hamid, Z. A., Alwahaibi, N., dan Mohamed, J. (2012). The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 12(1), 556–569. <https://doi.org/10.12816/0003082>
- Migliaccio, S., Di Nisio, A., Mele, C., Scappaticcio, L., Savastano, S., Colao, A., dan on behalf of Obesity Programs of nutrition Research and Assessment (OPERA) Group, E. (2019). Obesity and hypovitaminosis D: causality or casualty? *International Journal of Obesity Supplements*, 9(1), 20–31. <https://doi.org/10.1038/s41367-019-0010-8>
- Morello, M., Landel, V., Lacassagne, E., Baranger, K., Annweiler, C., Féron, F., dan Millet, P. (2018). Vitamin D Improves Neurogenesis and Cognition in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*, 55(8), 6463–6479. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0839-1>
- Morris et al., 2012. (2015). NIH Public Access. *Gerontology*, 61(6), 515–525. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.11.002>. Membrane-mediated
- Piha, T., Besselink, E., dan Lopez, A. D. (1993). Tobacco or health. In *World Health Statistics Quarterly* (Vol. 46, Issue 3). <https://doi.org/10.4103/2224-4018.129497>
- Proctor, R. N. (2012). The history of the discovery of the cigarette-lung cancer link: Evidentiary traditions, corporate denial, global toll. *Tobacco Control*, 21(2), 87–91. <https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2011-050338>
- Pusparini, P. (2018). DEFISIENSI VITAMIN D TERHADAP PENYAKIT (Vitamin D Deficiency and Diseases). *Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory*, 21(1), 90. <https://doi.org/10.24293/ijcpml.v21i1.1265>
- Raposo, L., Martins, S., Ferreira, D., Guimarães, J. T., dan Santos, A. C. (2017). Vitamin D, parathyroid hormone and metabolic syndrome - the PORMETS study. *BMC Endocrine Disorders*, 17(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s12902-017-0221-3>
- Royal College of Physicians. (2016). Nicotine without smoke: tobacco harm reduction. In *Pediatrics* (Vol. 136, Issue 5). <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2015-3222>
- Ruiz, J., dan T. Ameredes, B. (2012). The Cellular Effects of Carbon Monoxide in the Airway. *Current Molecular Medicine*, 13(1), 94–108. <https://doi.org/10.2174/156652413804486340>

- Sari, M. I., Sari, N., Darlan, D. M., dan Prasetya, R. J. (2018). Cigarette smoking and hyperglycaemia in diabetic patients. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 6(4), 634–637. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2018.140>
- Sari, M. M., dan Irawati, N. (2020). The Effect of Administering Vitamin D Supplement on Blood Glucose Level in Gestasional Diabetes Mellitus Rats. *Science Midwifery*, 9(1), 49–51. <https://midwifery.iocspublisher.org/index.php/midwifery/article/view/37>
- Soeroso, N. N., Intan, T. K., Ichwan, M., Tarigan, S. P., dan Wahyuni, A. S. (2020). *The Relationship between Exhaled Carbon Monoxide Test and Peak Expiratory Flow Rate in Smokers and Non-smokers*. 635–638. <https://doi.org/10.5220/0010081306350638>
- Tan, B. L., Norhaizan, M. E., dan Liew, W. (2018). Review Article Nutrients and Oxidative Stress : Friend or Foe ? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1–24.
- Tsur, A., Feldman, B. S., Feldhammer, I., Hoshen, M. B., Leibowitz, G., dan Balicer, R. D. (2013). Decreased serum concentrations of 25-hydroxycholecalciferol are associated with increased risk of progression to impaired fasting glucose and diabetes. *Diabetes Care*, 36(5), 1361–1367. <https://doi.org/10.2337/dc12-1050>
- Valladares, T., Cardoso, M. R., dan Aldrichi, J. M. (2019). Higher serum levels of Vitamin D are associated with lower blood glucose levels. *Menopause*, 26(7), 781–784. <https://doi.org/10.1097/GME.0000000000001308>
- Vu, C. U., Siddiqui, J. A., Wadensweiler, P., Gayen, J. R., Avolio, E., Bandyopadhyay, G. K., Biswas, N., Chi, N. W., O'Connor, D. T., dan Mahata, S. K. (2014). Nicotinic acetylcholine receptors in glucose homeostasis: The acute hyperglycemic and chronic insulin-sensitive effects of nicotine suggest dual opposing roles of the receptors in male mice. *Endocrinology (United States)*, 155(10), 3793–3805. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1320>
- Wu, L., dan Wang, R. (2005). Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 585–630. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.3>
- Yousefi Rad, E., Djalali, M., Koohdani, F., Saboor-Yaraghi, A. A., Eshraghian, M. R., Javanbakht, M. H., Saboori, S., Zarei, M., dan Hosseinzadeh-Attar, M. J. (2014). The effects of vitamin D supplementation on glucose control and insulin resistance in patients with diabetes type 2: A randomized clinical trial study. *Iranian Journal of Public Health*, 43(12), 1651–1656.