

**PENGARUH FREKUENSI PAPARAN ASAP ROKOK
TERHADAP KADAR KALSIUM DARAH
Studi Experimental pada Tikus Galur Wistar yang diberi Vitamin D**

Skripsi

untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai gelar Sarjana Kedokteran



Disusun Oleh:

Alfida Fitratunissa Aldian

30101900008

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG
2023**

SKRIPSI

PENGARUH FREKUENSI PAPARAN ASAP ROKOK TERHADAP KADAR KALSIUM DARAH Studi Experimental pada Tikus Galur Wistar yang diberi Vitamin D

Yang dipersiapkan dan disusun oleh

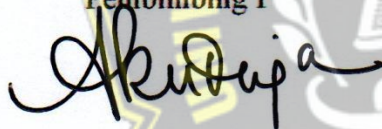
Alfida Fitratunissa Aldian

30101900008

telah dipertahankan di depan Dewan Penguji
pada tanggal 10 Juli 2023
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

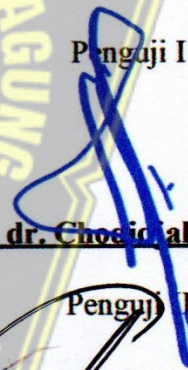
Susunan Tim Penguji

Pembimbing I



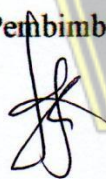
dr. Arini Dewi Antari, M.Biomed

Penguji I



Dr. dr. Chociah, M.Kes

Pembimbing II



dr. Kamilia Dwi Utami, M.Biomed

Penguji II



dr. Mohamad Arif, Sp.PD

Semarang, 25 Juli 2023

Fakultas Kedokteran

Dekan



Dr. dr. Setyo Trisnadi, Sp.KF. SH

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Alfida Fitratunissa Aldian

NIM : 30101900008

Dengan ini menyatakan bahwa Karya Tulis Ilmiah yang berjudul **“Pengaruh Frekuensi Paparan Asap Rokok terhadap Kadar Kalsium Darah (Studi Experimental pada Tikus Galur Wistar yang diberi Vitamin D)”** 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, Juli 2023



Handwritten signature of Alfida Fitratunissa Aldian.

Alfida Fitratunissa Aldian



PRAKATA

Assalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Alhamdulillahirabbil'amin, puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT, atas seluruh rahmat dan karunia-Nya penulis telah diberi kesehatan, ketabahan, kesabaran, dan kekuatan sehingga dapat menyelesaikan dengan baik skripsi yang berjudul, “Pengaruh Frekuensi Paparan Asap Rokok terhadap Kadar Kalsium Darah (Studi Experimental pada Tikus Galur Wistar yang diberi Vitamin D)” sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan studi serta untuk mendapatkan gelar Sarjana Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Penulis ingin mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada berbagai pihak yang telah memberi bantuan, bimbingan, dorongan, dan petunjuk sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan baik. Ucapan terima kasih penulis diberikan kepada :

1. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, SH, Sp.KF, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
2. dr. Arini Dewi Antari, M.Biomed dan dr. Kamilia Dwi Utami, M.Biomed selaku dosen pembimbing I dan II yang telah dengan sabar membimbing dan meluangkan waktu untuk memberikan arahan dalam menyelesaikan skripsi ini.
3. Dr. dr. Chodidjah, M.Kes dan dr. Mohamad Arif, Sp.PD selaku dosen penguji yang dengan kesabarannya telah meluangkan waktu dan upaya untuk mengarahkan dan membimbing penulis dalam penyelesaian skripsi ini.

4. Ayah Amilia Aldian, B.Eng, M.Eng, Ph.D, Ibu Sri Widowati, kakakku Shafa Kautsara Aldian dan adikku Elnoura Ramadhinta Aldian yang tak pernah berhenti mendo'akan serta memberikan perhatian, motivasi, dan dukungan selama penulis menempuh pendidikan di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung
5. Pak Mardi, Bu Eva, dan Pak Taufik selaku analis Laboratorium yang telah memberikan bantuan kepada penulis selama proses pelaksanaan penelitian
6. Terima kasih kepada teman-temanku seperti Muhammad Nurus Shobah, Dyah Nabilah Padantya, Mutiara Tri Ananda, Natasya Olga Shafira, Amalia Nurazima Fatikhasari, Hibrul Ummah, Resky Septiyani, Imma Hikmatun Nuzul, dan Eva Nur Hidayah yang telah menjadi *support system* dan sumber semangat penulis dalam menjalani kehidupan kuliah sarjana serta terima kasih juga kepada semua teman dan semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu

Semoga Allah SWT membalas semua kebaikan serta bantuan yang diberikan. Penulis berharap semoga penelitian ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Semarang, Juli 2023
Penulis,

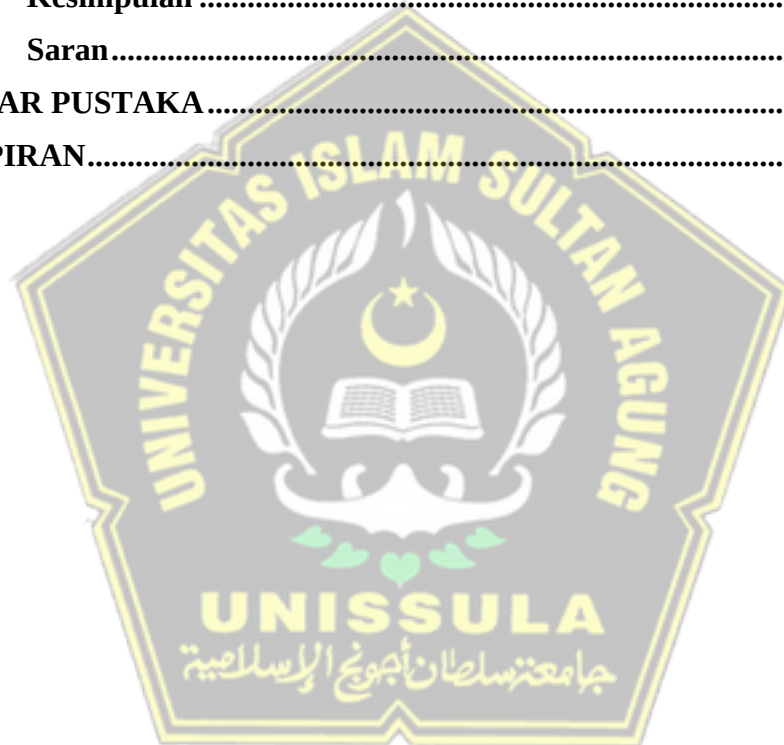
Alfida Fitratunissa Aldian

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
SURAT PERNYATAAN	iii
PRAKATA.....	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR SINGKATAN.....	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
INTISARI	xiii
BAB I.....	1
PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.3.1 Tujuan Umum	3
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.4.1 Manfaat Teoritis.....	4
1.4.2 Manfaat Praktis	4
BAB II	6
TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1. Kadar Kalsium Darah.....	6
2.1.1. Definisi.....	6
2.1.2. Fungsi Kalsium	7
2.1.3. Metabolisme Kalsium	7
2.1.4. Efek dari Defisiensi Kalsium	10
2.2. Frekuensi Asap Rokok.....	12
2.2.1. Definisi.....	12

2.2.2.	Kandungan Asap Rokok	12
2.2.3.	Efek Asap Rokok	13
2.3.	Vitamin D	15
2.3.1.	Definisi	15
2.3.2.	Kadar Vitamin D dalam serum	16
2.3.3.	Metabolisme	16
2.4.	Hubungan antara Frekuensi Paparan Asap Rokok dengan Kadar Kalsium Darah dan Vitamin D	19
2.5.	Kerangka Teori.....	21
2.6.	Kerangka Konsep	22
2.7.	Hipotesis	22
BAB III.....		23
METODE PENELITIAN		23
3.1.	Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	23
3.2.	Variabel dan Definisi Operasional.....	25
3.2.1.	Variabel	25
3.2.2.	Definisi Operasional.....	25
3.3.	Populasi dan Sampel	26
3.3.1.	Populasi Penelitian	26
3.3.2.	Sampel Penelitian.....	27
3.4.	Instrumen dan Bahan Penelitian	27
3.4.1.	Instrumen Penelitian.....	27
3.4.2.	Bahan Penelitian.....	27
3.5.	Cara Penelitian	28
3.5.1.	Persiapan Hewan Coba	28
3.5.2.	Pemberian Suplemen Vitamin D.....	28
3.5.3.	Perlakuan Hewan Coba	28
3.5.4.	Pengambilan Darah dan Pengumpulan Serum.....	29
3.5.5.	Pengukuran Variabel Penelitian	30
3.6.	Tempat dan Waktu	31
3.6.1.	Tempat Penelitian.....	31
3.6.2.	Waktu Penelitian	31

3.7. Alur Penelitian	32
3.8. Analisis Data	33
BAB IV	34
HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	34
4.1 Hasil Penelitian	34
4.2 Pembahasan	38
BAB V	43
KESIMPULAN DAN SARAN	43
5.1 Kesimpulan	43
5.2 Saran	43
DAFTAR PUSTAKA	44
LAMPIRAN	47



DAFTAR SINGKATAN

CaSR	: <i>Calcium sensing receptor</i>
(OH)D	: Hidroksivitamin D
(OH) ₂ D	: Dihidroksivitamin D
DBP	: Vitamin D <i>binding</i> protein
CYP27A1	: <i>Cytochrome p450 27A1</i>
CYP27B2	: <i>Cytochrome p450 27B2</i>
RANK	: <i>Receptor activator of Nuclear Factor</i>
RANKL	: <i>Receptor activator of Nuclear Factor Ligand</i>
OPG	: Osteoprotegerin
GATS	: <i>Global Adult Tobacco Survey</i>
ATP	: <i>Adenosine Triphosphatase</i>
MDA	: <i>Malondialdehyde</i>
FOUS	: <i>Fluorescent Oxidation Products</i>

DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1 Kadar Kalsium dalam Darah.....	7
Tabel 2. 2 Kadar Vitamin D dalam Darah	16
Tabel 4. 1. Hasil Rerata Kadar Kalsium Darah (mg/dL)	35
Tabel 4. 2 Hasil Uji Normalitas (<i>Shapiro Wilk Test</i>) dan Uji Homogenitas (<i>Levene's Test</i>) Kadar Kalsium Darah	36
Tabel 4. 3 Hasil Uji <i>One Way Anova</i>	37
Tabel 4. 4 Hasil Uji <i>Post Hoc Tamhane's</i>	37



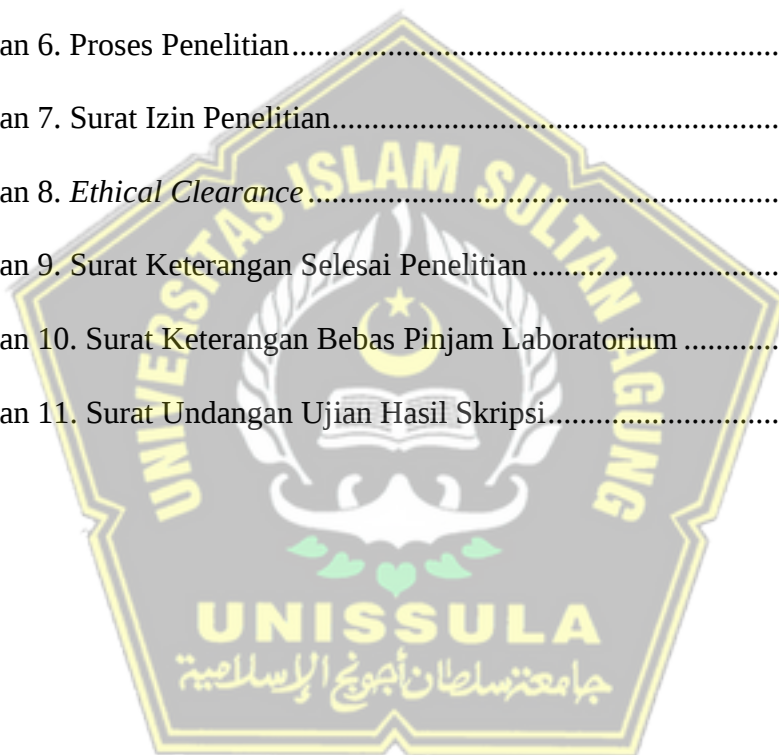
DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Efek Hormon Paratiroid (PTH)	10
Gambar 2. 2 Sintesis Vitamin D	18
Gambar 2. 3 Peranan Vitamin D dalam Mengatur Konsentrasi Kalsium Plasma	19
Gambar 2. 4 Kerangka Teori.....	21
Gambar 2. 5 Kerangka Konsep	22
Gambar 3. 1 Skema Rancangan Penelitian	23
Gambar 3. 2 Alur penelitian.....	32
Gambar 4. 1 Grafik Rerata Kadar Kalsium Darah.....	35



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Pengukuran Kadar Kalsium Darah	47
Lampiran 2. Hasil Rerata Kadar Kalsium Darah	49
Lampiran 3. Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas Kadar Kalsium Darah.....	50
Lampiran 4. Hasil Uji <i>One Way Anova</i> Kadar Kalsium Darah.....	52
Lampiran 5. Hasil uji <i>Post Hoc Tamhane's</i> Kadar Kalsium Darah.....	53
Lampiran 6. Proses Penelitian.....	54
Lampiran 7. Surat Izin Penelitian.....	56
Lampiran 8. <i>Ethical Clearance</i>	57
Lampiran 9. Surat Keterangan Selesai Penelitian.....	58
Lampiran 10. Surat Keterangan Bebas Pinjam Laboratorium	59
Lampiran 11. Surat Undangan Ujian Hasil Skripsi.....	60



INTISARI

Asap rokok memiliki senyawa kimia yang memberikan efek toksik terhadap kadar kalsium darah. Kadar kalsium darah yang rendah dapat menurunkan simpanan kalsium pada tulang. Salah satu cara yang dapat diambil adalah dengan memberi konsumsi vitamin D secara rutin untuk dapat meningkatkan kadar kalsium darah dalam tubuh.

Jenis penelitian yaitu penelitian eksperimental menggunakan desain *post-test only control group design* dengan menggunakan 30 ekor tikus jantan galur wistar sebagai sampel yang dibagi menjadi 6 kelompok secara random, yaitu K1 (tikus dipapar asap rokok 1x8/2 hari, tanpa vitamin D), K2 (tikus dipapar asap rokok 2x4/2 hari, tanpa vitamin D), K3 (tikus tidak dipapar asap rokok, diberi vitamin D 0,2 cc/ekor), P1 (tikus dipapar asap rokok 1x8/2 hari, diberi vitamin D 0,2 cc/ekor), P2 (tikus dipapar paparan asap rokok 2x4/2 hari, diberi vitamin D 0,2 cc/ekor), dan P3 (tikus dipapar asap rokok 2x4/hari, diberi vitamin D 0,2 cc/ekor) selama 14 hari. Pengukuran kadar kalsium darah dengan menerapkan metode spektrofotometri.

Rerata kadar kalsium darah tertinggi terdapat pada kelompok K3 (2,76) sedangkan rerata kadar kalsium darah terendah terdapat pada kelompok K1 (0,51). Uji analisa data dengan uji *One Way Anova* didapatkan sig. 0.022 ($p < 0,05$) memiliki perbedaan yang signifikan dan tidak didapatkan perbedaan signifikan antar kelompok.

Kesimpulan, pemberian vitamin D secara signifikan mampu meningkatkan kadar kalsium darah pada tikus galur wistar yang diberi paparan asap rokok.

Kata kunci : Asap rokok, kadar kalsium darah, vitamin D.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Asap rokok memiliki kandungan senyawa kimia seperti nikotin yang memiliki pengaruh buruk dalam penyerapan kalsium dalam tubuh dan mengakibatkan penurunan simpanan kalsium pada tulang (Nurpalah dan Hariyanti, 2015; Kamceva *et al.*, 2016). Berdasarkan penelitian sebelumnya, terdapat adanya penurunan kadar kalsium darah yang disebabkan oleh peningkatan frekuensi paparan asap rokok (Breitling, 2015; Ratajczak *et al.*, 2021). Senyawa kimia pada asap rokok akan menurunkan kemampuan tubuh dalam menyerap kalsium (Andin, 2016). Vitamin D diketahui dapat mempertahankan kadar kalsium dalam tubuh melalui mekanisme peningkatan absorpsi kalsium di dalam usus (Aji dan Fitriani, 2021). Namun, kurangnya asupan vitamin D, kurangnya paparan sinar matahari dan penggunaan *sunblock* dapat mengakibatkan defisiensi vitamin D (Parker, J., *et al.*, 2010). Saat ini, masih sangat jarang penelitian mengenai keterkaitan antara frekuensi paparan asap rokok, kadar kalsium, dan vitamin D serta masih sangat jarang penelitian kadar kalsium menggunakan sampel darah. Dengan ini, diperlukan penelitian lebih mendalam mengenai kadar kalsium darah sebagai parameter untuk mengetahui pengaruh paparan asap rokok terhadap tikus yang mendapat vitamin D.

Indonesia berada di posisi teratas dalam peringkat pada *The ASEAN Tobacco Control Atlas (SEATCA)* tahun 2018 sebagai negara yang memiliki jumlah perokok terbesar di kawasan ASEAN, dengan angka sebesar 33,8% (Lian and Dorotheo, 2021). Kementerian Kesehatan menyebutkan hasil survei *Global Adult Tobacco Survey (GATS)* yaitu adanya peningkatan jumlah individu perokok selama dekade terakhir sebanyak 8,8 juta orang di mana pada tahun 2011 terdapat 60,3 juta perokok sedangkan pada tahun 2021 meningkat menjadi 69,1 juta perokok di Indonesia. Pada tahun 2025, jumlah perokok di Indonesia diperkirakan akan semakin meningkat menjadi 96.776.800 perokok (Cameng dan Arfin, 2020). Baik secara langsung maupun tidak secara langsung, tar pada asap rokok memiliki potensi untuk menghambat proses pembentukan massa tulang sehingga dapat mempengaruhi kepadatan mineral tulang, salah satunya yaitu kalsium (Ratajczak *et al.*, 2021). Penurunan massa tulang dapat mengakibatkan osteoporosis dan meningkatkan risiko patah tulang (Ratajczak *et al.*, 2021). Pada tahun 2050, diperkirakan ada 6,3 juta manusia setiap tahunnya yang berisiko mengalami patah tulang dan lebih dari separuhnya berada di benua Asia (Limbong dan Syahrul, 2015).

Asap rokok dapat menurunkan kemampuan tubuh dalam menyerap kalsium (Andin, 2016). Kalsium pada tulang berfungsi untuk membantu tulang pada proses *remodelling* sehingga tulang dapat menjadi lebih padat. Namun, tar yang terkandung dalam asap rokok menghambat absorpsi kalsium sehingga kadar kalsium yang akan disimpan dalam tulang dapat berkurang. Akibatnya, tulang menjadi rapuh dan mudah terjadinya osteoporosis (Safna,

2016). Vitamin D dikatakan dapat meningkatkan kadar kalsium di mana vitamin D aktif yaitu vitamin D₃ mengalami dua kali hidroksilasi yaitu 1,25 (OH)₂D atau kalsitriol yang dapat mengakibatkan peningkatan konsentrasi kalsium dan fosfat plasma dengan cara meningkatkan absorpsi kalsium di dalam usus sehingga kadar kalsium dalam darah semakin banyak dan membantu proses *remodelling* tulang (Aji dan Fitriani, 2021). Adanya asap rokok juga dapat menurunkan produksi vitamin D yang aktif yaitu 1,25 (OH)₂D sehingga menyebabkan penurunan vitamin D dalam tubuh. Namun, hal ini dapat diatasi dengan kadar substrat serum yang lebih tinggi yaitu 25 (OH)D (Lange *et al.*, 2012). Oleh karena itu, dibutuhkan suplai vitamin D yang cukup untuk membantu proses penyerapan kalsium sehingga dapat memperkuat tulang pada perokok pasif.

Dari uraian tersebut, peneliti tertarik untuk melakukan riset terhadap pengaruh frekuensi paparan asap rokok terhadap kadar kalsium pada tikus wistar yang diberi vitamin D.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan penjelasan diatas, dapat dirumuskan bahwa permasalahan yang dapat diidentifikasi adalah: “Apakah frekuensi paparan asap rokok berpengaruh terhadap kadar kalsium darah pada Tikus Galur Wistar yang diberi vitamin D?”

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui pengaruh frekuensi paparan asap rokok terhadap kadar kalsium darah pada tikus yang diberi vitamin D

1.3.2 Tujuan Khusus

1.3.2.1 Untuk mengetahui perbedaan kadar kalsium darah pada tikus yang mendapat paparan asap rokok dengan frekuensi 8 batang dalam sekali paparan dan pada tikus yang mendapat paparan asap rokok dengan frekuensi 4 batang dalam 2 kali paparan.

1.3.2.2 Untuk mengetahui perbedaan kadar kalsium darah pada tikus yang mendapat paparan asap rokok dengan diberi vitamin D dan pada tikus yang mendapat paparan asap rokok tanpa diberi vitamin D

1.3.2.3 Untuk mengetahui perbedaan kadar kalsium pada tikus yang mendapat paparan asap rokok dengan diberi vitamin D dan pada tikus yang tidak mendapat paparan asap rokok dengan diberi vitamin D

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Sebagai informasi yang relevan untuk penelitian berikutnya dan sebagai dasar pengembangan penelitian terkait pengaruh frekuensi paparan asap rokok terhadap kadar kalsium darah pada tikus yang diberi vitamin D.

1.4.2 Manfaat Praktis

Harapan dari penelitian ini adalah dapat menyediakan informasi dalam bidang ilmu kedokteran dan masyarakat mengenai manfaat

pemberian vitamin D pada orang dengan kadar kalsium darah yang rendah.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kadar Kalsium Darah

2.1.1. Definisi

Kalsium termasuk dalam kategori mineral dari sekian banyak yang terdapat dalam tubuh manusia dengan jumlah paling banyak karena kalsium dibutuhkan pada semua jaringan tubuh khususnya pada pembentukan dan metabolisme tulang. Sebanyak 99% kalsium dalam tubuh yaitu berbentuk kalsium hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$) yang biasa terdapat pada tulang dan gigi dalam bentuk jaringan keras sedangkan sebanyak 1% terdapat pada cairan intraseluler dan ekstraseluler (Ross *et al.*, 2011).

Kalsium darah merupakan kalsium yang terdapat pada cairan ekstraseluler. Dalam darah, separuh kalsium serum terikat pada albumin serum sebanyak 40-45% atau globulin sebanyak 2-5%, sebagian kecil terikat pada anion kecil seperti karbonat, sitrat, laktat, fosfat serta sisanya dalam bentuk terionisasi (Ca^{2+}) yaitu sebanyak 45-50% (Lumachi *et al.*, 2011).

Tabel 2. 1 Kadar Kalsium dalam Darah

Interpretasi	Kadar Kalsium Darah
Kadar Kalsium Darah Rendah	<8,600 mg/dL
Kadar Kalsium Darah Normal	8,600-10,30 mg/dL
Kadar Kalsium Darah Tinggi	>10,30 mg/dL

(Dialab, 2015)

2.1.2. Fungsi Kalsium

Kalsium memainkan peran penting pada tulang dalam mencegah timbulnya osteoporosis. Namun, kalsium juga memiliki peran yang besar pada kegiatan enzim, syaraf, dan darah. Berbagai manfaat kalsium untuk keseharan dan kondisi tubuh antara lain :

- a. Meningkatkan kelancaran peredaran darah
- b. Meningkatkan kelenturan otot
- c. Menjaga keseimbangan asam dan basa darah
- d. Mencegah terjadinya osteoporosis
- e. Sebagai mineralisasi gigi (Widiarsih, 2018)

2.1.3. Metabolisme Kalsium

Kalsium memiliki peran pada beberapa proses fisiologis sehingga diperlukan adanya pengaturan yang tepat (Lumachi *et al.*, 2011). Kadar kalsium dalam serum diatur secara ketat oleh tubuh untuk tetap dalam kadar normal yaitu antara 8,5 dan 10,5 mg/dL (Ross *et al.*, 2011).

Secara garis besar, jalur metabolisme kalsium diatur oleh hormon paratiroid. Hormon paratiroid memiliki dua efek untuk memobilisasi kalsium dan fosfat dari tulang yaitu fase cepat dan fase lambat. Pada fase cepat, hormon paratiroid berperan pada proses osteolisis dengan berikatan pada protein reseptor yang terdapat pada osteoblast dan osteosit sehingga pompa kalsium teraktivasi karena peningkatan kelancaran penyerapan kalsium di sisi cairan tulang. Selanjutnya, terjadi perpindahan ion kalsium dari membran sel menuju cairan ekstraseluler. Sedangkan pada fase lambat, hormon paratiroid berperan pada proses aktivasi osteoklas (Hall, J. E. and Arthur C, Guyton, 2016).

Hormon paratiroid juga berperan dalam mengubah bentuk vitamin D agar menjadi bentuk aktif yaitu konversi dari 25-hidroksikolekalsiferol menjadi 1,25-dihidroksikolekalsiferol sehingga mampu berperan dalam melakukan peningkatan absorpsi kalsium oleh usus. Normalnya, absorpsi ion kalsium sulit dilakukan melalui usus sehingga membutuhkan vitamin D dalam bentuk aktif untuk membantu proses absorpsi. 1,25-dihidroksikolekalsiferol akan mendorong terbentuknya calbindin (protein pengikat kalsium) pada sel epitel usus selama periode dua hari. Calbindin merupakan protein pengikat kalsium yang memiliki 4 domain pengikat kalsium aktif sehingga dapat menampung 4 Ca^{2+} pada jaringan (Pujol *et al.*, 2018). Calbindin berfungsi pada

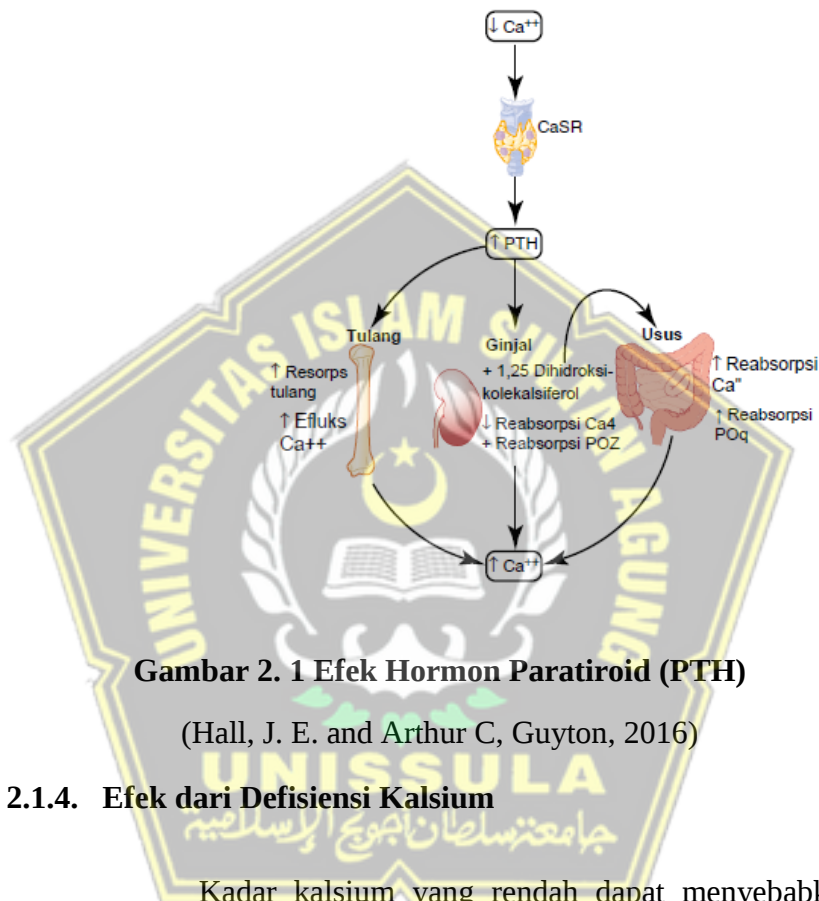
brush border sel-sel tersebut agar dapat membawa kalsium menuju ke dalam sitoplasma sel. Setelah itu, kalsium akan berpindah melalui membran basolateral sel melalui proses difusi terfasilitasi (Hall, J. E. and Arthur C, Guyton, 2016).

Pada keadaan normal, sebanyak 99% kalsium yang terfiltrasi akan diserap kembali oleh tubulus ginjal dan sekitar 100 mg/hari kalsium akan diekskresi ke dalam urin. Ketika konsentrasi kalsium dalam darah rendah, hormon paratiroid akan mengatur peningkatan proses reabsorpsi kalsium pada ginjal sehingga hampir tidak terjadi pembuangan kalsium yang terjadi lewat urin (Hall, J. E. and Arthur C, Guyton, 2016).

Kadar ion kalsium dalam cairan ekstraseluler dapat mengalami peningkatan maupun penurunan. Ketika ada perubahan ion kalsium, akan merangsang *calcium-sensing receptor* (CaSR) pada membran sel paratiroid. CaSR merupakan *G protein-coupled receptor* yang dapat merangsang aktivitas fosfolipase C dan memperbanyak produksi inositol 1,4,5-trifosfat intraseluler dan pembentukan diasilgliserol apabila dirangsang oleh ion kalsium (Hall, J. E. and Arthur C, Guyton, 2016).

Penurunan kalsium akan merangsang CaSR yang menyebabkan peningkatan hormon paratiroid. Peningkatan hormon paratiroid akan merangsang resorpsi tulang dan menginduksi pelepasan kalsium ke dalam cairan ekstraseluler. Hormon

paratiroid juga akan melakukan peningkatan absorpsi kalsium pada usus halus. Selain itu, akan terjadi peningkatan reabsorpsi kalsium pada tubulus ginjal dan penurunan ekskresi kalsium (Hall, J. E. and Arthur C, Guyton, 2016).



Gambar 2. 1 Efek Hormon Paratiroid (PTH)

(Hall, J. E. and Arthur C, Guyton, 2016)

2.1.4. Efek dari Defisiensi Kalsium

Kadar kalsium yang rendah dapat menyebabkan banyak gangguan pada organ tubuh serta meningkatkan risiko penyakit. Beberapa efek dari penurunan kadar kalsium yaitu:

a. Osteoporosis

Tulang merupakan tempat penyimpanan terbesar dari kalsium yaitu sebanyak 99%. Kalsium yang tersimpan dalam tulang memberikan kepadatan pada tulang sehingga melindungi tulang dari risiko patah tulang. Namun, ketika asupan kalsium

kurang akan menyebabkan kadar kalsium darah menurun. Hal ini akan memrangsang penyerapan kembali tulang yang memicu pelepasan kalsium dari tulang menuju cairan ekstraseluler. Jika kondisi ini berlangsung secara konsisten, akan mengakibatkan tulang menjadi keropos dan meningkatkan risiko patah tulang (Sutiari, 2017).

b. Obesitas

Obesitas merupakan kondisi ketika jumlah energi yang masuk dengan jumlah energi yang keluar tidak seimbang. Konsumsi kalsium yang rendah dapat merangsang lipogenesis dan menghambat lipolisis secara bersamaan sehingga menyebabkan adanya akumulasi lemak tubuh (Sutiari, 2017).

c. Batu Ginjal

Kalsium dapat menurunkan risiko batu ginjal karena kalsium akan bergabung dengan oksalat dari sumber makanan ketika di dalam usus. Garam kalsium oksalat sulit untuk diserap dan asam oksalat yang kurang tersedia dapat menyebabkan terbentuknya batu. Kurangnya konsumsi kalsium menyebabkan pengikatan oksalat menurun sehingga meningkatkan risiko terjadinya batu ginjal (Sutiari, 2017).

2.2.Frekuensi Asap Rokok

2.2.1. Definisi

Asap rokok merupakan hasil pembakaran dari merokok. Asap rokok terdiri dari dua bagian, pertama asap utama (*mainstream smoke*) merupakan asap yang dihirup oleh perokok, kedua asap samping (*sidestream smoke*) merupakan jenis asap yang berasal dari ujung rokok. Asap samping memberikan efek negatif bagi orang lain yang menghirup karena asap samping menghasilkan lebih dari 4000 senyawa kimia dengan 400 senyawa kimia bersifat toksik (Batubara *et al.*, 2013).

2.2.2. Kandungan Asap Rokok

1. Nikotin

Nikotin merupakan senyawa alkaloid yang paling banyak terdapat pada rokok yang dihasilkan dari tembakau. Nikotin memiliki sifat toksik yang dapat memasuki aliran darah dan dapat melintasi penghalang darah otak hingga mencapai sistem saraf pusat. Selain itu, nikotin memiliki sifat alkali kuat sehingga dapat melalui membran sel saraf dan dapat dengan mudah terserap melalui permukaan kulit (Nururrahmah, 2015). Nikotin memiliki sifat seperti halnya kafein yaitu dapat memberikan rangsangan aktivitas syaraf-syaraf kolinergik yang

ada bagian frontal basal otak sehingga dapat merangsang dan meningkatkan kesadaran (Irish, L. A., *et al.*, 2015).

2. Karbon Monoksida

Karbon monoksida merupakan zat berbahaya yang berwujud gas. Gas karbon monoksida mempunyai kecenderungan atau daya tarik yang kuat terhadap hemoglobin yaitu 200 kali lebih efektif dibandingkan oksigen sehingga dapat membentuk karboksihemoglobin (Nururrahmah, 2015).

3. TAR

TAR atau *Total Aerosol Residue* merupakan zat kimia beracun dan berbahaya yang terbentuk akibat pembakaran rokok. TAR yang terkandung pada asap rokok dapat mengakibatkan penyakit kanker karena TAR akan menyebabkan terbentuknya pengendapan yang menempel pada permukaan dalam paru-paru yang dapat memicu perkembangan kanker (Nururrahmah, 2015).

2.2.3. Efek Asap Rokok

Asap rokok memiliki komponen senyawa berbahaya berupa bahan kimia berminyak yaitu nikotin yang memiliki karakteristik tidak berwarna. Nikotin dapat menghasilkan rangsangan pada individu yang mempengaruhi sistem jantung ketika menghirup asap rokok. Seorang perokok juga dapat terjadi kematian mendadak disebabkan oleh sirkulasi darah yang tidak optimal

karena adanya peningkatan sirkulasi *catecholamine*, yang mengakibatkan pembuluh darah berkerut dan terhambat pada saat detak jantung. Nikotin dapat menyebabkan penyempitan atau konstriksi pembuluh arteri (*vasospasm*) pada individu yang mengalami kondisi *atherosclerotic* (Safna, 2016).

Denyut jantung pada individu yang merokok cenderung cepat daripada orang yang tidak merokok sedangkan pada individu perokok kekurangan normal zat asam yang yang dibutuhkan sehingga dapat menyebabkan penyakit jantung koroner. Tar juga dapat mengganggu irama jantung serta konsistensi darah dalam tubuh menjadi lengket yang dapat menyebabkan trombosis koroner karena adanya penyumbatan yang diakibatkan oleh adanya pembentukan trombus darah yang menghalangi atau menghambat salah satu pembuluh darah utama. Selain itu, tar memberikan dampak negatif terhadap penyerapan kalsium dalam tubuh yang mengakibatkan penurunan kepadatan tulang atau osteoporosis (Safna, 2016).

Selain itu, tar dapat menyebabkan terjadinya stres mitokondria dan memproduksi molekul radikal bebas atau *reactive oxygen species* (ROS) dalam kuantitas yang banyak. Tar akan mengurangi sirtuin-3 (*sirt3 expression*) dan terjadi peningkatan oksida nitrat. Tar juga akan mengurangi viabilitas osteoblast dengan meningkatkan akumulasi H_2O_2 dan menghambat NF-kB

(*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). Selain itu, aktivasi yang dimediasi tar dari reseptor $\alpha 7$ pada tikus akan mendorong peningkatan regulasi RANKL (*receptor activator of nuclear factor ligand*) dan menghambat ekspresi osteoprotegerin (OPG) sehingga akan mengaktifasi osteoklas dan resorpsi tulang (Nicholson *et al.*, 2021).

Derajat perilaku merokok dapat terdeteksi melalui penggunaan alat pengukur Indeks Brinkman (IB) untuk menghitung jumlah batang rokok yang dihisap atau dikonsumsi dengan memperhitungkan total tahun merokok dikali dengan jumlah rokok yang dikonsumsi setiap harinya. Hasil 0-199 disebut dengan perokok ringan, hasil 200-599 disebut dengan perokok sedang, dan hasil lebih dari 600 disebut perokok berat (Purwinadi, I G., 2020). Berdasarkan penelitian Lolita *et al.* (2020), pemberian jumlah rokok 8 batang pada tikus dapat memberikan efek pada tikus.

2.3. Vitamin D

2.3.1. Definisi

Vitamin D merupakan mikronutrien larut lemak yang memiliki fungsi utama yaitu mengatur penyerapan kalsium dan homeostasis, meregulasi proliferasi dan diferensiasi gen (Fiannisa, 2019). Vitamin D memiliki dua bentuk bioekuivalen yaitu vitamin

D₂ (*ergocalciferol*) dan vitamin D₃ (*cholecalciferol*). Vitamin D₂ (*ergocalciferol*) dapat didapatkan dari makanan sumber nabati maupun suplemen yang dikonsumsi secara oral. Sedangkan vitamin D₃ (*cholecalciferol*) dapat diperoleh melalui radiasi sinar matahari serta melalui sumber makanan seperti ikan berminyak, susu, *yogurt*, sereal, kedelai dan lain-lain (Rimahardika, 2016).

2.3.2. Kadar Vitamin D dalam serum

Kadar vitamin D dalam sirkulasi darah dapat diukur dengan melakukan pengukuran kadar 25-hidroksivitamin D dalam darah. Terdapat tiga golongan kadar 25-hidroksivitamin D dalam darah yaitu golongan normal, golongan insufisiensi vitamin D dan golongan defisiensi vitamin D (Suryadinata *et al.*, 2017).

Tabel 2. 2 Kadar Vitamin D dalam Darah

Interpretasi	25-hydroxyvitamin D	
Defisiensi	<20 ng/mL	<50 nmol/L
Insufisiensi	20-30 ng/mL	50-75 nmol/L
Sufisiensi	>30 ng/mL	75 nmol/L

(Suryadinata *et al.*, 2017)

2.3.3. Metabolisme

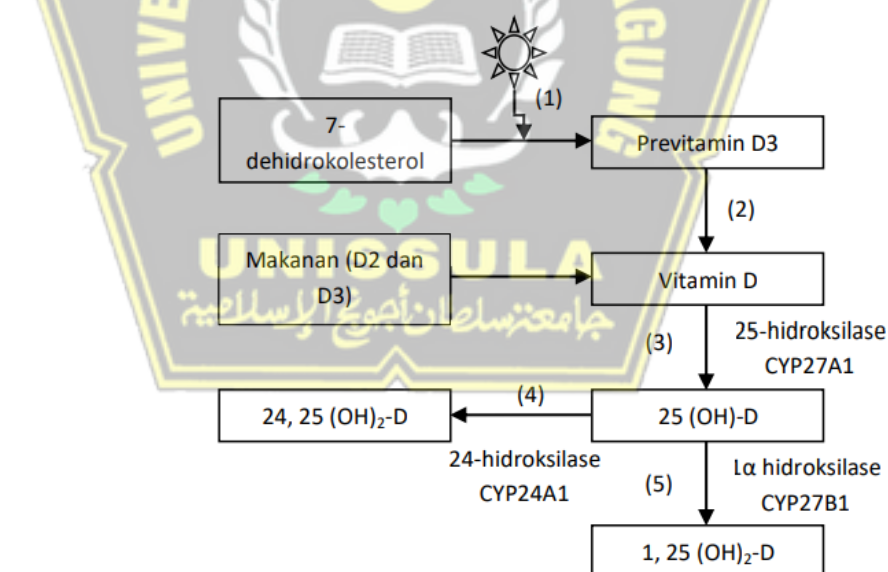
Vitamin D didapatkan melalui pajanan sinar ultraviolet B dan dari makanan sehingga terdapat metabolisme vitamin D pada kulit dan saluran pencernaan. Vitamin D akan masuk ke saluran

darah untuk ditransportasikan ke hati dengan terikat oleh protein pengangkut yang disebut *Vitamin D Binding Protein* (DBP). Vitamin D secara biologis memiliki bentuk yang tidak aktif setelah memasuki aliran darah sehingga perlu mengalami aktivasi melalui dua perubahan biokimia dengan menambahkan dua gugus hidroksil (-OH) (Syauqy, 2015).

Di dalam hati, vitamin D yang diangkut oleh kompleks DBP akan mengalami penambahan gugus hidroksil posisi 25-hydroxylase menjadi 25 (OH)D (25-hidroksivitamin D) atau kalsitriol dengan pertolongan atau bantuan enzim CYP27A1. Setelah itu, 25 (OH)D dibebaskan ke dalam peredaran darah dan dibawa ke ginjal dan akan menghadapi proses penambahan gugus hidroksil pada posisi 1 α menjadi 1,25 (OH)₂D (1,25-dihidroksivitamin D) dan 24,25 (OH)₂D (24,25-dihidroksivitamin D) dengan bantuan enzim mitokondria lainnya yaitu enzim CYP27B2. Bentuk aktif vitamin D yaitu 1,25 (OH)₂D. Reseptor 1,25 (OH)₂D terdapat lebih dari 30 jaringan dengan mekanisme kerja yaitu dirangsang oleh hormon paratiroid dan terhambat karena tingginya kadar kalsium dan fosfat, sedangkan 24,25 (OH)₂D memiliki fungsi yang terbatas (Pusparini, 2018; Fiannisa, 2019).

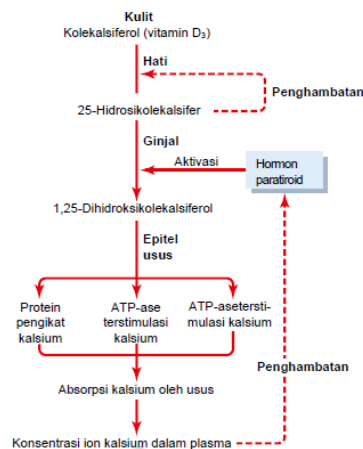
Bentuk aktif vitamin D akan merangsang produksi protein yang mengikat kalsium yaitu calbindin di sel epitel usus yang

berfungsi sebagai pengangkut kalsium ke dalam sitoplasma. Setelah itu, kalsium akan berpindah melalui membran basolateral sel melalui proses difusi terfasilitasi. Kecepatan absorpsi kalsium meningkat seiring dengan peningkatan jumlah protein yang mengikat kalsium sehingga jika terdapat peningkatan vitamin D maka akan meningkatkan protein pengikat kalsium yang dapat menyebabkan peningkatan absorpsi kalsium. Selain itu, bentuk aktif vitamin D dapat merangsang pembentukan ATPase (*adenosine triphosphatase*) dapat merangsang kalsium di *brush border* sel epitel dan suatu alkaline fosfatase di sel epitel (Hall, J. E. and Arthur C, Guyton, 2016).



Gambar 2. 2 Sintesis Vitamin D

(Fiannisa, 2019)



Gambar 2. 3 Peranan Vitamin D dalam Mengatur Konsentrasi Kalsium Plasma

(Hall, J. E. and Arthur C, Guyton, 2016)

2.4. Hubungan antara Frekuensi Paparan Asap Rokok dengan Kadar Kalsium Darah dan Vitamin D

Asap rokok secara langsung maupun tidak langsung dapat memengaruhi kepadatan mineral tulang. Senyawa yang terkandung dalam asap rokok dapat memengaruhi osteoklastogenesis dan keseimbangan kalsium-fosfat (Nurpalah dan Hariyanti, 2015).

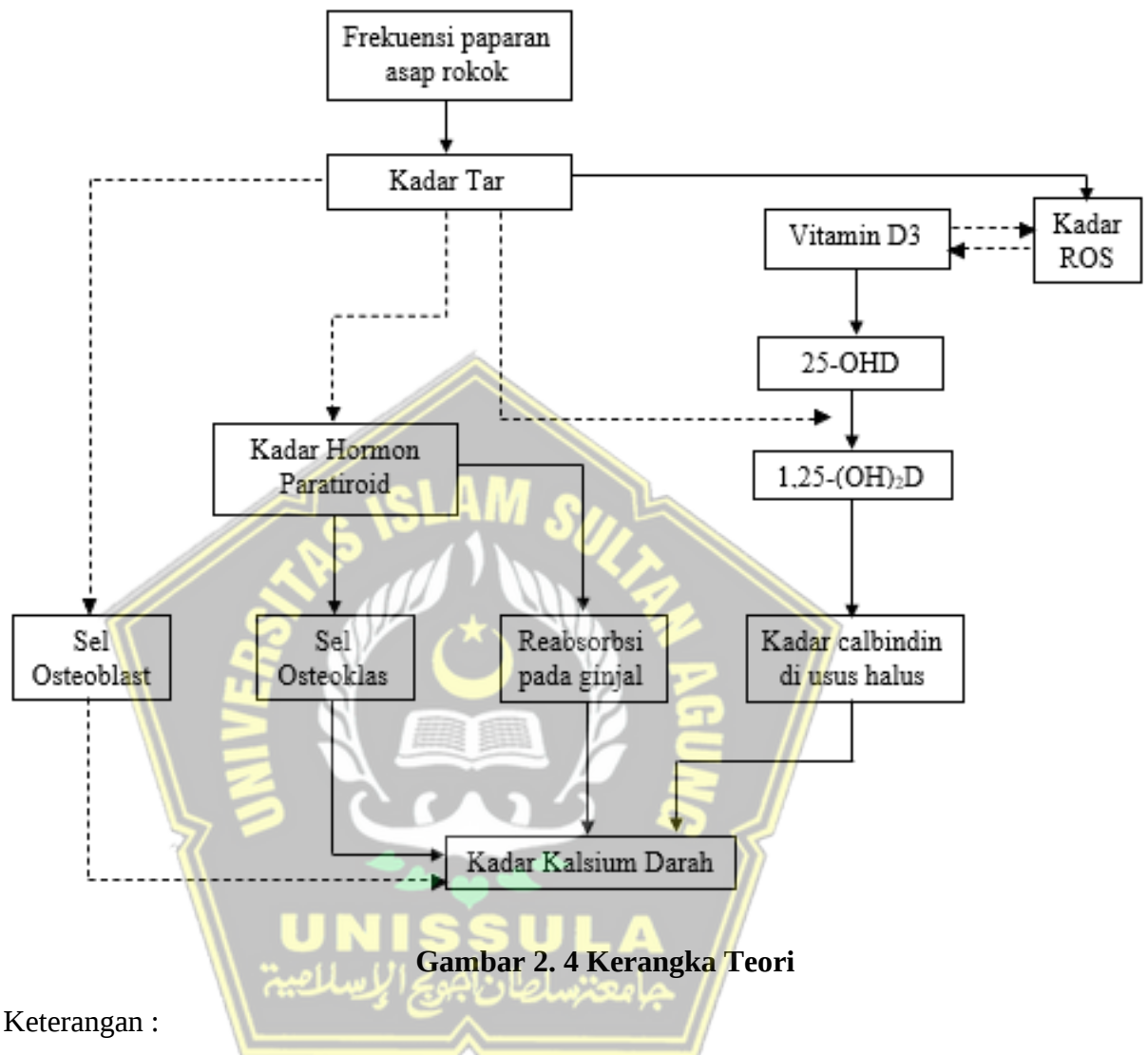
Asap rokok dapat menghambat aktifitas hormon paratiroid sehingga terjadi gangguan pada aktifitas osteoklas dan osteoblast. Hormon paratiroid yang rendah akan merangsang peningkatan kadar kalsium dalam darah. Selain itu, osteoklas dan osteoblast secara terus menerus melakukan proses *remodelling* tulang dengan diatur oleh sejumlah factor seperti hormon, sitokin, dan jalur RANK-RANKL-OPG (*receptor activator of nuclear factor/receptor activator of nuclear factor ligand/osteoprogesterin*). Nikotin pada asap rokok dapat berikatan dengan

reseptor nikotinik pada osteoblast sehingga dapat menyebabkan kematian sel osteoblast serta dapat meningkatkan aktifitas sel osteoklas (Ratajczak *et al.*, 2021). Aktivitas osteoklas yang tinggi dan tidak diimbangi oleh sel osteoblast akibat kematian sel osteoblast menyebabkan adanya peningkatan kalsium dalam serum (Fujiyoshi *et al.*, 2016).

Tar juga dapat meningkatkan kadar kortisol serum yang dapat memengaruhi aktivitas sel tulang dan menghambat penyerapan kalsium pada saluran pencernaan dan reabsorpsi Ca ginjal sehingga menyebabkan massa tulang menurun (Hall, J. E. and Arthur C, Guyton, 2016; Ratajczak *et al.*, 2021). Tar menyebabkan terjadinya stres mitokondria dan memproduksi radikal bebas atau *reactive oxygen species* (ROS) dalam kuantitas banyak (Nicholson *et al.*, 2021).

Vitamin D termasuk antioksidan alami yang dapat mengurangi sitokin proinflamasi yang diakibatkan oleh rokok. Adanya asupan vitamin D tambahan dapat meningkatkan kadar vitamin D dalam tubuh yang menyebabkan penurunan sitokin proinflamasi (Rusmini *et al.*, 2019). Vitamin D dapat membantu dalam proses ekskresi kalsium pada usus. Bentuk aktif vitamin D akan merangsang pembentukan protein calbindin yang akan mengangkut kalsium ke dalam sitoplasma sel. Namun, senyawa pada asap rokok juga dapat memengaruhi vitamin D pada tubuh karena adanya asupan vitamin D yang rendah serta penghambatan hidroksilasi 25OHD menjadi bentuk aktif yaitu $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}$ oleh tar (Ratajczak *et al.*, 2021).

2.5.Kerangka Teori



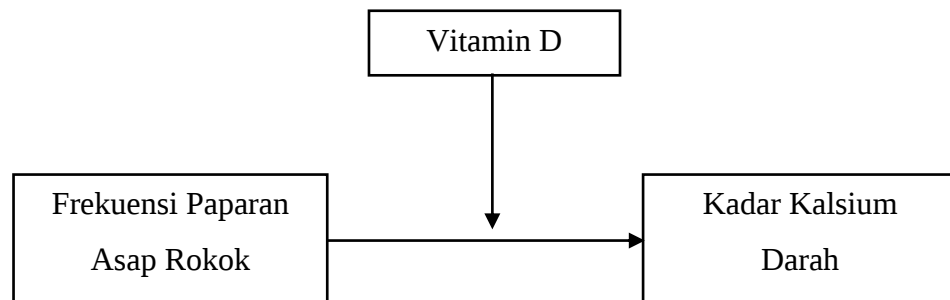
Gambar 2. 4 Kerangka Teori

Keterangan :

—————> : merangsang

- - - - -> : menghambat

2.6.Kerangka Konsep



Gambar 2. 5 Kerangka Konsep

2.7.Hipotesis

1. Pemberian Frekuensi Paparan Asap Rokok dapat mempengaruhi Kadar Kalsium Darah pada Tikus
2. Pemberian Frekuensi Paparan Asap Rokok dapat mempengaruhi Kadar Kalsium Darah pada Tikus yang diberi Vitamin D
3. Pemberian Paparan Asap Rokok dapat mempengaruhi Kadar Kalsium Darah pada Tikus

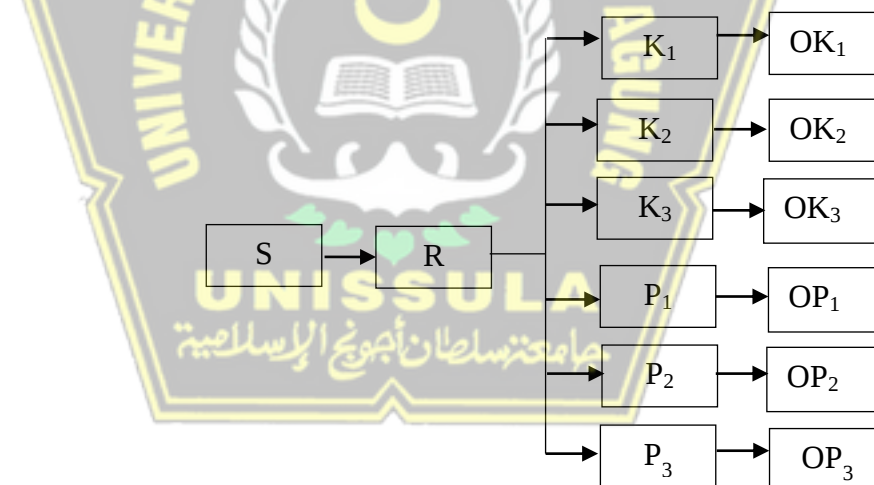
BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimen dengan desain penelitian *post-test only control group design* pada Tikus Galur Wistar. Perlakuan yang diberikan adalah pemberian paparan asap rokok dan pemberian vitamin D pada Tikus Galur Wistar, sedangkan keluarannya berupa kadar kalsium darah.

Penelitian rancangan *Post-Test Only Control Group Design*, secara grafis dapat diilustrasikan sebagai berikut:



Gambar 3. 1 Skema Rancangan Penelitian

Keterangan :

S : Sampel berupa tikus putih *Rattus Norvegicus*

R : Randomisasi

K₁ : Kelompok kontrol diberi paparan asap rokok dengan frekuensi 1 kali dengan 8 batang rokok/2 hari, tanpa pemberian vitamin D 0,2 cc/ekor

K₂ : Kelompok kontrol diberi paparan asap rokok dengan frekuensi 2 kali dengan 4 batang rokok/2 hari, tanpa pemberian vitamin D 0,2 cc/ekor

K₃ : Kelompok kontrol tanpa asap rokok dengan pemberian vitamin D 0,2 cc/ekor

P₁ : Perlakuan kelompok paparan asap rokok dengan frekuensi 1 kali dengan 8 batang rokok/2 hari + vitamin D 0,2 cc/ekor

P₂ : Perlakuan kelompok paparan asap rokok dengan frekuensi 2 kali dengan 4 batang rokok/2 hari + vitamin D 0,2 cc/ekor

P₃ : Perlakuan kelompok paparan asap rokok dengan frekuensi 2 kali dengan 4 batang rokok setiap hari + vitamin D 0,2 cc/ekor

OK₁ : Observasi kadar kalsium darah kelompok K₁

OK₂ : Observasi kadar kalsium darah kelompok K₂

OK₃ : Observasi kadar kalsium darah kelompok K₃

OP₁ : Observasi kadar kalsium darah kelompok P₁

OP₂ : Observasi kadar kalsium darah kelompok P₂

OP₃ : Observasi kadar kalsium darah kelompok P₃

3.2. Variabel dan Definisi Operasional

3.2.1. Variabel

3.2.1.1. Variabel Bebas

- Frekuensi paparan asap rokok
- Vitamin D

3.2.1.2. Variabel Tergantung

Kadar Kalsium Darah

3.2.2. Definisi Operasional

3.2.2.1. Frekuensi Paparan Asap Rokok

Frekuensi Paparan Asap rokok adalah banyaknya jumlah asap rokok yang didapatkan dalam sehari/minggu pada Tikus Galur Wistar yang secara sengaja diberi paparan melalui lubang pada kandang tikus.

Paparan asap rokok yang diberikan dengan frekuensi 8 batang dengan pemberian 2 kali dilakukan pada jam 10.00 WIB dan 14.00 WIB sedangkan paparan asap rokok yang diberikan dengan frekuensi 8 batang dengan 1 kali pemberian dilakukan pada waktu 10.00 WIB mulai dari hari ke-8 hingga hari ke-21.

Skala : Nominal

3.2.2.2. Vitamin D

Vitamin D dari suplemen diberikan melalui oral menggunakan sonde oral dengan dosis 0,2 cc/ekor dalam setiap

pemberian dengan menggunakan spuit 1 cc. pemberian vitamin D dilakukan setiap jam 16.00 WIB, setiap hari pada hari ke 8 hingga hari ke 21 pada hari yang sama dengan pemberian paparan asap rokok. Vitamin D diberikan sebagai perlakuan preventif.

Skala : Nominal

3.2.2.3. Kadar Kalsium Darah

Kadar kalsium dalam darah merupakan konsentrasi kalsium yang terdapat dalam darah yang dapat diukur pada serum yang diperoleh dari hasil sentrifugasi darah vena orbita tikus. Serum dinilai menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 650 nm.

Nilai kadar kalsium yang diperoleh adalah menggunakan satuan (mg/dL). Kadar kalsium darah diukur pada hari ke 22.

Skala : Rasio

3.3. Populasi dan Sampel

3.3.1. Populasi Penelitian

Populasi yang menjadi subjek penelitian ini adalah tikus Galur Wistar yang telah dilakukan adaptasi selama 7 hari di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung (UNISSULA) Semarang.

3.3.2. Sampel Penelitian

3.3.2.1. Kriteria Inklusi

1. Tikus jantan
2. Tikus sehat (aktif bergerak, tidak cacat dan tidak terluka).
3. Berat badan 150 gram
4. Usia tikus 4 bulan

3.3.2.2. Kriteria Dropout

1. Tikus mati saat adaptasi maupun penelitian

3.4. Instrumen dan Bahan Penelitian

3.4.1. Instrumen Penelitian

Kandang tikus beserta dengan tempat pakan serta minum, timbangan, sonde lambung, disposable syringes, smoking box, spuit 3 cc, blue tip, yellow tip, tabung Eppendorf 10 mL, mesin sentrifugasi, tabung reaksi, rak tabung, pipet tetes, mikropipet, kuvet, spektrofotometer

3.4.2. Bahan Penelitian

Tikus jantan, serum tikus, ransum pakan standar, aquadest, larutan Arsenazo III, larutan standar kalsium nitrat, vitamin D, minyak zaitun, rokok kretek.

3.5. Cara Penelitian

3.5.1. Persiapan Hewan Coba

Subjek yang digunakan pada penelitian adalah 30 ekor Tikus Galur Wistar usia 4 bulan. Setiap kelompok berisi 5 Tikus Galur Wistar. Setiap kelompok dialokasikan secara random dan diaklimatisasi selama 7 hari yaitu hari ke 0 hingga hari ke 7 penelitian dengan diberi pakan standar dan air standar.

3.5.2. Pemberian Suplemen Vitamin D

Vitamin D diberikan setiap hari pada jam 16.00 WIB dimulai dari hari ke 8 hingga hari ke 21 bersamaan dengan pemberian paparan asap rokok. Dosis vitamin D yang diberikan merujuk pada penelitian sebelumnya yaitu 0,2 cc/ekor. Vitamin D diberikan menggunakan spuit 1cc. Vitamin D diberikan secara oral menggunakan sonde oral dengan cara sonde oral dipasang pada atap mulut tikus dan secara perlahan dimasukkan sampai ke esofagus. Setelah itu, masukkan cairan vitamin D.

3.5.3. Perlakuan Hewan Coba

Tikus yang akan diberikan paparan asap rokok dimasukkan ke dalam kandang paparan yang dibuat dari logam besi dengan dimensi ukuran yang memanjang panjang 120 cm, lebar 70 cm, dan tinggi 60

cm. Pada bagian tengah kandang diletakkan kotak kaleng yang diberi lubang 2 cm agar asap rokok yang ada di dalam kotak dapat keluar melalui lubang tersebut. Batang rokok akan dimasukkan ke dalam kandang tikus melalui lubang yang sudah disiapkan sebagai tempat rokok. Rokok yang digunakan adalah jenis rokok kretek. Alas kandang berupa serutan kayu. Proses pemberian asap rokok dilakukan dari hari ke 8 hingga hari ke 21 dengan cara pemberian asap rokok sesuai ketentuan masing-masing kelompok. Pada kelompok K1, P1 dan P3 diberikan paparan asap rokok dengan frekuensi 8 batang dengan sekali pemberian dalam sehari yaitu diberikan pada jam 10.00 WIB. Sedangkan pada kelompok K2 dan P2 diberikan paparan asap rokok dengan frekuensi 4 batang dengan dua kali pemberian dalam sehari yaitu diberikan pada jam 10.00 WIB dan jam 14.00 WIB. Kelompok K1, K2, P1, dan P2 diberikan paparan asap rokok setiap dua hari sekali sedangkan kelompok P3 diberikan paparan asap rokok setiap hari. Tikus tanpa paparan asap rokok akan diletakkan pada kandang tanpa pengasapan.

3.5.4. Pengambilan Darah dan Pengumpulan Serum

Pengambilan sampel darah dilaksanakan pada hari ke 22 melalui vena orbita tikus. Darah yang diambil yaitu sekitar 1 ml dengan menggunakan spuit. Darah ditempatkan ke dalam tabung *eppendorf* dan berikan penanda sampel. Setelah itu, darah dalam tabung *eppendorf* akan dilakukan proses sentrifugasi yang dilakukan

dengan memutar tabung pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Hasil sentrifugasi berupa cairan berwarna putih kekuningan (serum) dapat diambil dan ditampung untuk ditentukan kadar kalsiumnya.

3.5.5. Pengukuran Variabel Penelitian

a. Pemeriksaan Kadar Kalsium

Kadar kalsium diukur menggunakan alat spektrofotometer dengan sampel berupa serum darah tikus. Larutan serum diambil sebanyak 10 µl menggunakan mikropipet dan *yellow tip*, kemudian ditambahkan dengan larutan arsenazo III sebagai reagen kalsium sebanyak 1000 µl. Prinsip pengujian arsenazo III yaitu kalsium akan membentuk kompleks warna biru dengan arsenazo III pada pH yang netral di mana intensitas warnanya berbanding lurus dengan konsentrasi kalsium. Penyimpangan kadar magnesium akan diatasi melalui penambahan senyawa 8-hydroxyquinoline-5-sulfonic acid yang termasuk dalam campuran reagen. Pengukuran dilakukan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 650 nm.

Perhitungan Kalsium Serum (mg/dL) :

$$\frac{\text{Abs.Sampel}}{\text{Abs.Standard Kalsium}} \times \text{Konsentrasi Standard Kalsium}$$

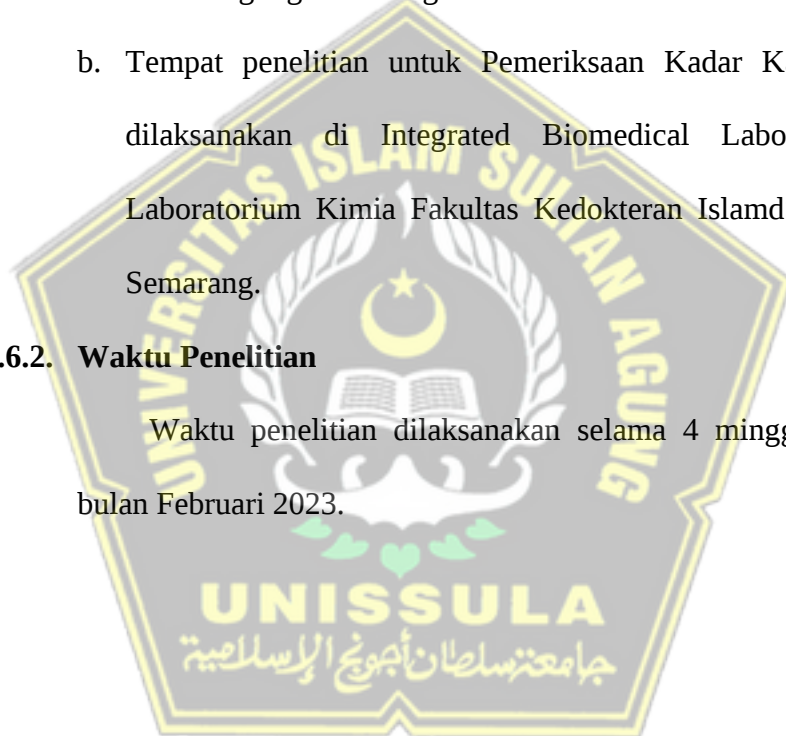
3.6. Tempat dan Waktu

3.6.1. Tempat Penelitian

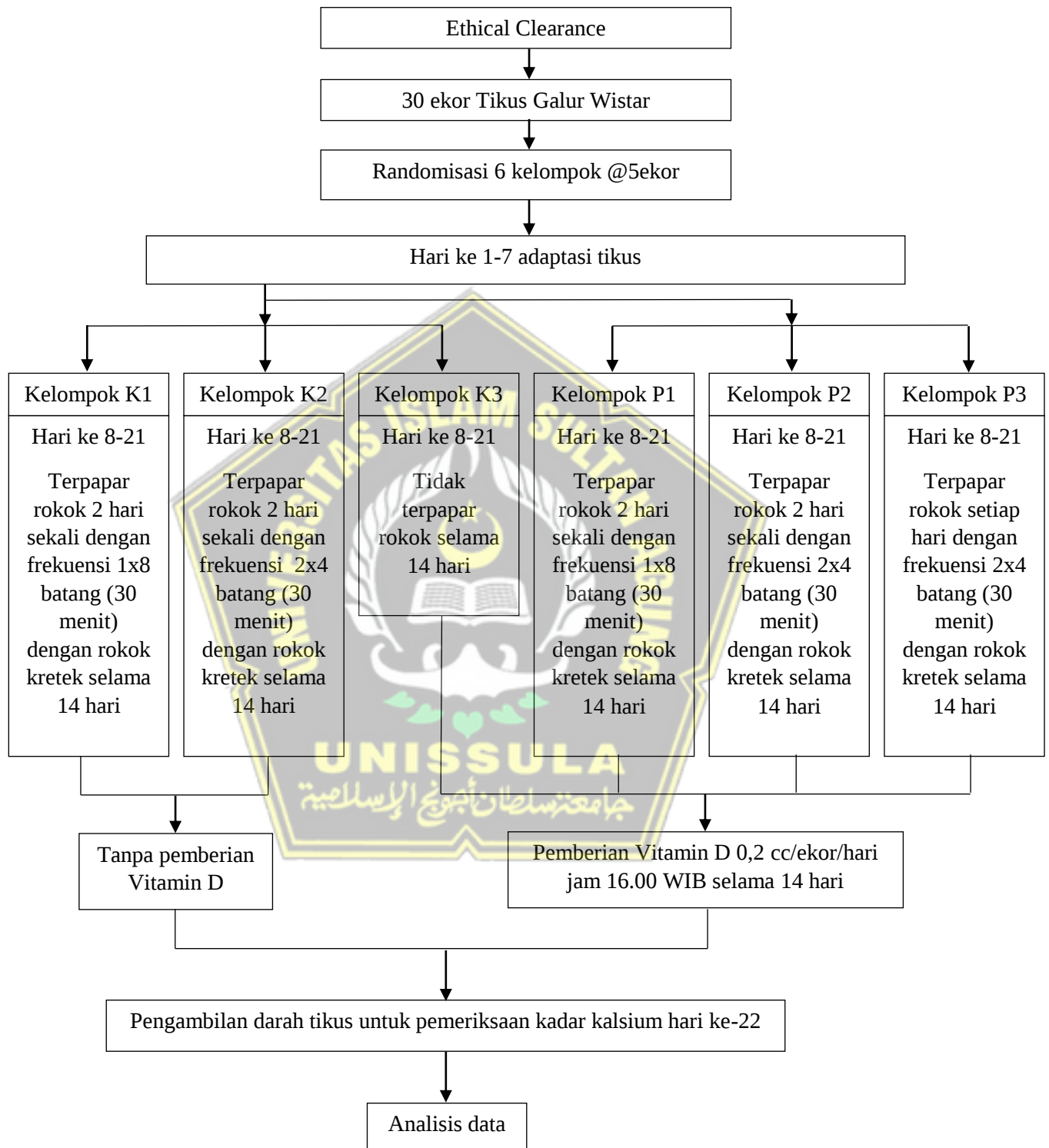
- a. Tempat penelitian untuk pemberian paparan rokok dan vitamin D pada tikus dilaksanakan di Integrated Biomedical Laboratory (IBL) Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Islam Sultan Agung Semarang.
- b. Tempat penelitian untuk Pemeriksaan Kadar Kalsium Darah dilaksanakan di Integrated Biomedical Laboratory (IBL) Laboratorium Kimia Fakultas Kedokteran IslamdSultan Agung Semarang.

3.6.2. Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan selama 4 minggu mulai dari bulan Februari 2023.



3.7. Alur Penelitian



Gambar 3. 2 Alur penelitian

3.8. Analisis Data

Data yang didapatkan berupa kadar kalsium dalam satuan mg/dl yang diperoleh menggunakan spektrofotometer metode nyala. Setelah itu, data dilakukan analisis statistik menggunakan SPSS *software* Ver. 16.0 for Windows. Data dilakukan pengujian normalitas dengan menggunakan pengujian *Shapiro-Wilk* (sampel <50) dan pengujian homogenitas dengan menggunakan Uji *Levene Test*. Data dinyatakan terdistribusi normal dan homogen jika hasil pengujian *Saphiro Wilk* dan *Levene's Test* mendapatkan hasil $p > 0,05$.

Hasil data tidak memenuhi distribusi normal sehingga dilakukan upaya transformasi agar menghasilkan data yang terdistribusi normal dan terdapat ketidakhomogenan dalam variansi data meskipun telah dilakukan upaya transformasi. Uji selanjutnya yaitu dilakukan uji *One Way ANOVA*, selanjutnya dilakukan pengujian *Post Hoc Tamhane's*.

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

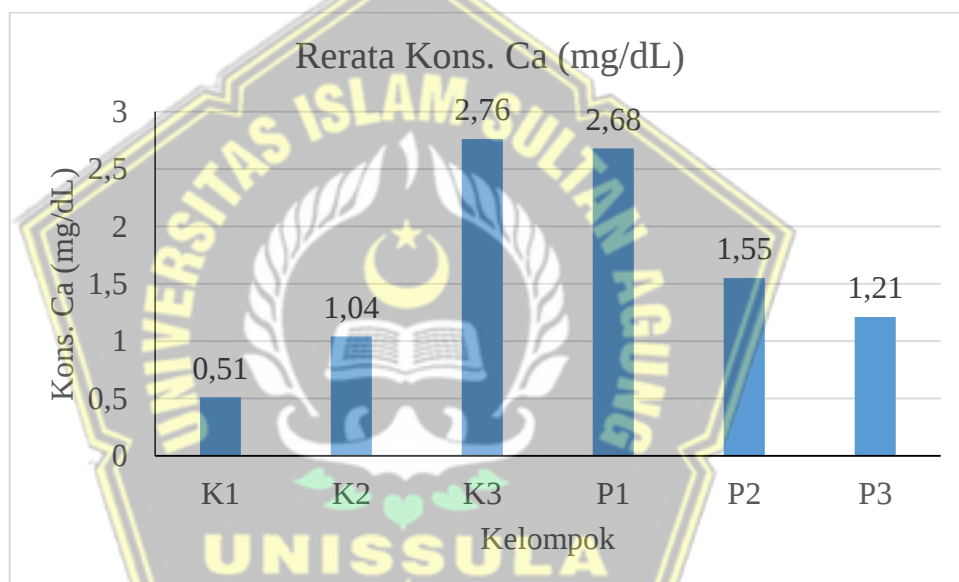
4.1 Hasil Penelitian

Penelitian ini berfokus pada dampak atau efek dari frekuensi paparan asap rokok terhadap kadar kalsium darah pada tikus Galur Wistar yang diberi vitamin D dilaksanakan di *Integrated Biomedical Laboratory* (IBL) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang (UNISSULA) selama 30 hari. Dalam penelitian ini, terdapat 30 ekor subjek uji berupa tikus Galur Wistar yang dibagi menjadi 6 kelompok yang berbeda secara random, yaitu K1 (tikus dipapar asap rokok 1x8/2 hari, tanpa vitamin D), K2 (tikus dipapar asap rokok 2x4/2 hari, tanpa vitamin D), K3 (tikus tidak dipapar asap rokok, diberi vitamin D 0,2 cc/ekor), P1 (tikus dipapar asap rokok 1x8/2 hari, diberi vitamin D 0,2 cc/ekor), P2 (tikus dipapar paparan asap rokok 2x4/2 hari, diberi vitamin D 0,2 cc/ ekor), dan P3 (tikus dipapar asap rokok 2x4/hari, diberi vitamin D 0,2 cc/ ekor). Selama proses penelitian dari adaptasi hingga pengambilan sampel, tidak terdapat subjek yang sakit ataupun mengalami kematian sehingga tidak ada subjek *drop out*.

Penelitian ini menggunakan desain penelitian *post-test only control group design* sebagai metode eksperimentalnya. Rerata kadar kalsium darah yang dihasilkan pada setiap kelompok dapat dilihat pada Tabel 4.1 dan Gambar 4.1 berikut

Tabel 4. 1. Hasil Rerata Kadar Kalsium Darah (mg/dL)

Kelompok	N	Rerata $\pm$ SD	Median
K1	5	0,51 $\pm$ 0,53	0,40
K2	5	1,04 $\pm$ 1,26	0,57
K3	5	2,76 $\pm$ 2,13	2,76
P1	5	2,68 $\pm$ 1,37	2,95
P2	5	1,55 $\pm$ 1,56	0,94
P3	5	1,21 $\pm$ 0,36	1,04



Keterangan :

- K1 : tikus diberi paparan asap rokok 1x8/2 hari, tanpa vitamin D
 K2 : tikus diberi paparan asap rokok 2x4/2 hari, tanpa vitamin D
 K3 : tikus tanpa paparan asap rokok, diberi vitamin D 0,2 cc/ekor
 P1 : tikus diberi paparan asap rokok 1x8/2 hari, diberi vitamin D 0,2 cc/ekor
 P2 : tikus diberi paparan asap rokok 2x4/2 hari, diberi vitamin D 0,2 cc/ekor
 P3 : tikus diberi paparan asap rokok 2x4/hari, diberi vitamin D 0,2 cc/ekor

Gambar 4. 1 Grafik Rerata Kadar Kalsium Darah

Berdasarkan Gambar 4.1, didapatkan bahwa rerata kadar kalsium darah tertinggi yaitu pada kelompok K3, sedangkan rerata kadar kalsium darah terendah yaitu pada kelompok K1. Rerata kadar kalsium darah mulai dari terendah hingga tertinggi yaitu kelompok K1 (0,51 mg/dL), kelompok K2 (1,04 mg/dL), kelompok P3 (1,21 mg/dL), kelompok P2 (1,55 mg/dL), kelompok P1 (2,68 mg/dL), dan kelompok K3 (2,76 mg/dL). Sebaran data kadar kalsium darah dari 6 kelompok dilakukan analisis uji normalitas dengan uji *Shapiro Wilk* dan uji homogenitas dengan uji *Levene's Test*. Hasil uji normalitas dan homogenitas didapatkan data tidak terdistribusi normal ($p < 0,05$) dan varian data tidak homogen ($p < 0,05$). Selanjutnya, dilakukan upaya transformasi untuk mendapatkan data yang normal dan homogen. Setelah itu, dilakukan uji normalitas dan homogenitas kembali dengan hasil ditunjukkan pada Tabel 4.2.

Tabel 4. 2 Hasil Uji Normalitas (*Shapiro Wilk Test*) dan Uji Homogenitas (*Levene's Test*) Kadar Kalsium Darah

Kelompok	<i>p-value</i>	
	<i>Shapiro Wilk Test</i>	<i>Levene's Test</i>
K1	0,085*	0,001
K2	0,182*	
K3	0,243*	
P1	0,573*	
P1	0,881*	
P3	0,586*	

Keterangan: * = data normal ($p > 0,05$), ** = data homogen ($p > 0,05$)

Berdasarkan Tabel 4.2, diketahui bahwa distribusi data kadar kalsium darah pada setiap kelompok normal ($p > 0,05$) sedangkan pada uji

homogenitas diketahui bahwa data tetap memiliki varian tidak homogen ($p < 0,05$).

Berdasarkan hasil pengujian normalitas dan homogenitas tersebut, diteruskan tahap pengujian *One Way Anova* dengan hasil yang diperoleh adalah sebagai berikut:

Tabel 4. 3 Hasil Uji *One Way Anova*

Kelompok	Uji Beda Signifikansi (<i>Asymp. Sig.</i>)
K1	0,022*
K2	
K3	
P1	
P2	
P3	

Keterangan: * = berbeda signifikan ($p < 0,05$)

Berdasarkan Tabel 4.3, hasil analisis parametrik dengan pengujian *One Way Anova* didapatkan nilai signifikansi berjumlah 0,022 ($p < 0,05$) yang menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok. Selanjutnya, dilakukan uji analisis *Post Hoc Tamhane's* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok.

Tabel 4. 4 Hasil Uji *Post Hoc Tamhane's*

Kelompok	K1	K2	K3	P1	P2	P3
K1		0,983	0,587	0,493	0,929	0,818
K2			0,867	0,486	1,000	0,993
K3				1,000	0,997	0,997
P1					0,943	0,549
P2						1,000
P3						

Keterangan : * = berbeda signifikan ($p < 0,05$)

Berdasarkan Tabel 4.4, didapatkan hasil bahwa tidak terdapat perbedaan nilai p ($p > 0,05$) yang signifikan antar semua kelompok.

4.2 Pembahasan

Penelitian ini diawali dengan memberikan paparan asap rokok pada kelompok K1, K2, P1, P2, dan P3 sedangkan kelompok K3 menjadi kelompok kontrol yang tidak diberi paparan asap rokok. Selain itu, pada kelompok K3, P1, P2, dan P3 diinduksi dengan Vitamin D sedangkan kelompok K1 dan K2 menjadi kelompok paparan tanpa induksi Vitamin D. Perlakuan diberikan selama 14 hari kemudian dilakukan pengambilan data kadar kalsium darah pada masing-masing tikus menggunakan metode spektrofotometer.

Rerata kadar kalsium darah tertinggi terdapat pada kelompok K3 dengan rerata kadar kalsium darah sebesar 2,76 mg/dL sedangkan rerata kadar kalsium terendah terdapat pada kelompok K1 dengan rerata kadar kalsium darah sebesar 0,51 mg/dL. Hal ini mengindikasikan bahwa dengan memberikan vitamin D dapat meningkatkan kadar kalsium darah sedangkan pemberian rokok dapat menurunkan kadar kalsium darah. Nabila dan Anna (2021) pada penelitiannya menyebutkan bahwa vitamin D akan mengalami dua kali hidroksilasi untuk menjadi bentuk aktif yaitu kalsitriol yang dapat meningkatkan penyerapan kalsium di dalam usus. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Rianti Nurpalah dan Rinrin Hariyanti (2015) menunjukkan terdapat 40% sampel perokok yang memiliki kadar kalsium darah rendah. Asap rokok didapatkan dari proses pembakaran rokok yang menghasilkan senyawa kimia yang bersifat toksik

salah satunya yaitu tar yang dapat memproduksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) atau radikal bebas dalam kuantitas yang banyak (Batubara *et al.*, 2013; Nicholson *et al.*, 2021). Radikal bebas yang memiliki tingkat pembentukan paling tinggi dalam tubuh adalah superoksida, yang kemudian mengalami transformasi menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2). Selama tahap propagasi, hidrogen akan mengalami perubahan menjadi radikal hidroksil (-OH). Radikal hidroksil ini merupakan penyebab utama terjadinya peroksidasi lemak pada membran sel yang mengakibatkan kerusakan sel. Sel darah yang rusak akan menyebabkan kalsium sulit berikatan dengan protein dan albumin dalam darah sehingga menyebabkan penurunan kadar kalsium darah (Parwata, 2015).

Dalam kondisi normal atau tidak stres, tubuh mampu menetralkan ROS menggunakan antioksidan dalam tubuh. Namun, pada kondisi stres, dibutuhkan adanya tambahan antioksidan dari luar tubuh. Salah satunya dengan dilakukan penambahan Omega 3. Omega 3 dapat berperan sebagai antioksidan dengan menurunkan kadar *Malondialdehyde* (MDA) dan *Fluorescent Oxidation Products* (FOUS) yang dihasilkan oleh asap rokok. Dengan adanya penambahan Omega 3, diharapkan adanya penurunan kadar ROS sehingga vitamin D dapat berperan maksimal dalam meningkatkan kadar kalsium darah (Küçük, Z. *et al.*, 2019).

Pada kelompok K1 dengan K2 dan kelompok P1 dengan P2 dilakukan perbandingan untuk melihat kadar kalsium darah pada kelompok yang terpapar asap rokok dalam jumlah 1x8 batang setiap 2 hari

sekali dengan kelompok yang terkena paparan asap rokok dalam jumlah 2x4 batang setiap 2 hari sekali. Kelompok K1 dan K2 merupakan kelompok tanpa induksi vitamin D sedangkan kelompok P1 dan P2 adalah kelompok dengan induksi vitamin D. Berdasarkan hasil penelitian, kedua kelompok perbandingan tersebut tidak didapatkan perbedaan yang signifikan. Namun, dengan melihat rerata kadar kalsium darah, didapatkan adanya perbedaan di mana kadar kalsium darah kelompok K2 lebih tinggi dibanding K1 sedangkan kelompok P1 lebih tinggi dibanding P2. Selain itu, berdasarkan penelitian J. Hernigou dan F. Schuind (2019), disebutkan bahwa kadar tar dalam tubuh dapat menurun dengan cepat dalam beberapa jam setelah penghentian paparan sehingga pada kelompok P1 yang memiliki waktu *recovery* lebih lama dibandingkan dengan kelompok P2 dapat memiliki kadar kalsium darah yang lebih tinggi.

Perbandingan selanjutnya yaitu kelompok K1 dibandingkan dengan kelompok P1 dan kelompok K2 dibandingkan dengan kelompok P2. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok K1 dengan P1 dan kelompok K2 dengan P2 tidak memiliki perbedaan yang signifikan. Namun, dengan melihat adanya perbedaan rerata menunjukkan bahwa jumlah kalsium darah pada kelompok P1 dan P2 lebih tinggi. Hal ini mengartikan bahwa kadar kalsium darah pada kelompok yang terpapar asap rokok dengan diinduksi vitamin D akan lebih tinggi kelompok kelompok K1 dan K2 yang tidak diinduksi vitamin D. Peran vitamin D pada penelitian ini yaitu sebagai antioksidan terhadap ROS yang

dihasilkan oleh paparan asap rokok serta untuk meningkatkan kadar kalsium darah. Penelitian Zahra *et al.* (2019) menyebutkan bahwa vitamin D dapat mengurangi tingkat kerusakan oksidatif dengan meningkatkan pertahanan sistem antioksidan seperti kandungan glutathione, glutathione peroxidase, dan superoxide dismutase. Selain itu, berdasarkan penelitian Ubeti *et al.* (2017) disebutkan bahwa vitamin D dapat meningkatkan aktivitas enzim nitric oxide endotel sintase (eNOS) dan produksi nitric oxide (NO) yang berfungsi untuk mempertahankan fungsi normal endotel sehingga metabolisme kalsium intrasel dapat tetap terjaga. Selain berperan sebagai antioksidan, vitamin D juga dapat meningkatkan kadar kalsium darah dengan meningkatkan penyerapan kalsium di dalam usus. Hasil yang tidak signifikan diduga karena kurangnya dosis vitamin D. Berdasarkan literatur Paramita dan Melva (2017), 25(OH)D sebagai bentuk utama vitamin D di sirkulasi darah memiliki masa hidup sekitar 2-3 minggu sedangkan 1,25(OH)₂D memiliki masa hidup sekitar 4 jam sehingga dengan jangka waktu yang singkat, vitamin D belum dapat meningkatkan kadar kalsium darah secara maksimal. Namun, pada penelitian ini tidak dilakukan pengecekan jumlah vitamin D.

Pada kelompok K3 dengan P3 tidak terdapat perbedaan yang signifikan. Kedua kelompok tersebut merupakan kelompok yang mendapatkan induksi vitamin D. Namun, pada kelompok K3 yang tidak mendapatkan paparan asap rokok memiliki hasil yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok P3 yang mendapatkan paparan asap

rokok. Hal ini disebabkan karena vitamin D pada kelompok K3 dapat bekerja secara maksimal untuk meningkatkan kadar kalsium darah sedangkan peran vitamin D pada kelompok P3 kurang maksimal untuk meningkatkan kadar kalsium darah karena digunakan sekaligus sebagai antioksidan eksogen. Penambahan kalsium juga dapat meningkatkan kadar kalsium darah karena penambahan kalsium dapat menurunkan hormon paratiroid sehingga dapat merangsang untuk meningkatkan kadar kalsium darah (Widiastuti, R. O., *et al.*, 2018).

Pada penelitian ini terdapat keterbatasan yaitu tidak dilakukan pengukuran uji *Pretest* pada kadar kalsium darah sehingga tidak dapat membandingkan peningkatan atau penurunan dari kadar kalsium darah sebelum dan sesudah diberikan perlakuan. Keterbatasan lain dari penelitian ini adalah tidak diketahui kadar vitamin D sehingga tidak dapat menjelaskan pengaruh antara kadar vitamin D dengan kadar kalsium darah. Selain itu, keterbatasan dari penelitian ini adalah tidak diketahui kepadatan mineral tulang sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait kepadatan mineral pada tulang dengan rontgen.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

- 5.1.1 Kadar kalsium darah pada kelompok yang diberi paparan asap rokok sebanyak 8 batang dalam sekali paparan dengan kelompok yang diberi paparan asap rokok sebanyak 4 batang dalam 2 kali paparan tidak memiliki perbedaan yang signifikan
- 5.1.2 Kadar kalsium darah pada kelompok yang diberi paparan asap rokok dapat meningkat dengan penambahan vitamin D
- 5.1.3 Kadar kalsium darah pada kelompok yang diberi vitamin D dapat meningkat secara maksimal tanpa adanya paparan asap rokok

5.2 Saran

- 5.2.1 Perlu dilakukan penelitian untuk menilai kadar kalsium darah dan kadar vitamin D sebelum dan sesudah perlakuan
- 5.2.2 Perlu dilakukan penelitian dengan diberikan tambahan suplemen yang dapat meningkatkan kadar kalsium darah berupa kalsium atau omega 3
- 5.2.3 Perlu dilakukan penelitian untuk melihat kepadatan mineral tulang dengan foto rontgen

DAFTAR PUSTAKA

- Aji, Nabila J. dan Fitriani, Anna, 2021, *Role of Calcium on Vitamin D absorbtion among diabetic patient*, *Muhammadiyah Journal of Nutrition and Food Science (MJNF)*, 2(2), doi: 10.24853/mjnf.2.2.69-79.
- Andin, S., 2016, *Osteoporosis The Silent Disease*, Yogyakarta, Rapha Publishing.
- Batubara, I. V. D. *et al.*, 2013, Pengaruh Paparan Asap Rokok Kretek terhadap Kualitas Spermatozoa Mencit Jantan (*Mus Musculus*), pp. 330–337.
- Breitling, L. P., 2015, *Smoking as an Effect Modifier of the Association of Calcium Intake With Bone Mineral Density*, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 100(2), pp. 626–635, doi: 10.1210/jc.2014-2190.
- Cameng, D. K. J. dan Arfin, 2020, Analisis Penerapan Kebijakan Earmarking Tax dari Dana Bagi Hasil Cukai Hasil Tembakau terhadap Kesehatan Masyarakat, Simposium Nasional Keuangan Negara, pp. 480–1115.
- Dialab, 2015, *Insert Kit Dialab Production Kalsium, Dialab Production*.
- Fiannisa, R., 2019, Vitamin D Sebagai Pencegahan Penyakit Degeneratif Hingga Keganasan, *Medula*, 9(3), pp. 385–392.
- Fujiyoshi, A. *et al.*, 2016, *Smoking Habits and Parathyroid Hormone Concentrations in Young Adults: The CARDIA study*, *Bone Reports*, 5, pp. 104–109, doi: 10.1016/j.bonr.2016.04.003.
- Hall, J. E. and Arthur C. Guyton, 2016, *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology 13th Edition, Department of Physiology and Biophysics, University of Mississippi Medical Center*
- Hernigou, J. and F. Schuind, 2019, *Tobacco and Bone Fractures*, Brussels, Erasme Hospital, University of Brussels, BJR Vol. 8, No. 6, pp. 255-265
- Irish, L. A., Kline, C. E., Gunn, H. E., Buysse, D. J. & Hall, M. H., 2015, *The Role of Sleep Hygiene in Promoting Public Health: a review of empirical evidence. Sleep Medicine Reviews Volume 22. P.23-36: Elsevier.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.smrv.2014.10.001>
- Kamceva, G. *et al.*, 2016, *Cigarette Smoking and Oxidative Stress in Patients with Coronary Artery Disease*, *Macedonian Journal of Medical Sciences*
- Küçük, Zahide, Burcu Timur, Hayri Gözlükgiller, Hakan Timur, Kudret Erkenekli, Muzaffer Çaydere & Aytekin Tokmak, 2019, *Protective Effect of Omega 3 and Vitamin D in Preventing Lung-tissue Damage of Newborn Rats Exposed to Cigarette Smoke during Intrauterine Period*, *Int. J. Morphol.*, 37(1):87-92

- Lange, N. E. *et al.*, 2012, *Vitamin D deficiency, smoking, and lung function in the normative aging study*, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, doi: 10.1164/rccm.201110-1868OC
- Lian, T. Y. and Dorotheo, U., 2021, *The Tobacco Control Atlas: ASEAN Region, Southeast Asia Tobacco Control Alliance (SEATCA)*.
- Limbong, E. A. dan Syahrul, F., 2015, Rasio Risiko Osteoporosis menurut Indeks Massa Tubuh, Paritas, dan Konsumsi Kafein, *Jurnal Berkala Epidemiologi*, 3(2), p. 194, doi: 10.20473/jbe.v3i22015.194-204.
- Lumachi, F. *et al.*, 2011, *Calcium Metabolism and Hypercalcemia in Adults*, *Current Medicinal Chemistry*, 18(23), pp. 3529–3536, doi: 10.2174/092986711796642599.
- Nicholson, T. *et al.*, 2021, *The impact of E-cigarette vaping and vapour constituents on bone health*, *Journal of Inflammation (United Kingdom)*, 18(1), pp. 1–10. doi: 10.1186/s12950-021-00283-7.
- Nurpalah, R. dan Hariyanti, R., 2015, Gambaran Kadar Kalsium Darah Pada Perokok, *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada: Jurnal Ilmu-ilmu Keperawatan, Analis Kesehatan dan Farmasi*, 13(1), pp. 95–99, doi: 10.36465/jkbth.v13i1.18.
- Nururrahmah, 2015, Pengaruh Rokok terhadap Kesehatan dan Pembentukan Karakter Manusia', *Prosiding Seminar Nasional*, 01(1), pp. 78–84.
- Parker J, Hashmi O, Dutton D, Mavrodaris A, Stranges S, Kandala N-B, Clarke A, Franco OH, 2010, *Levels of vitamin D and cardiometabolic disorders: systematic review and meta-analysis*. *Maturitas* 65(3): 225-236
- Parwata, I Made Oka A., 2015, *Antioksidan, Kimia Terapan*, Universitas Udayana
- Pujol, J. B. *et al.*, 2018, *Isx9 regulates calbindin D28K expression in pancreatic β cells and promotes β cell survival and function*, *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), pp. 1–21, doi: 10.3390/ijms19092542.
- Purnawinadi, I Gede, 2020, Kategori Perokok berdasarkan Indeks Brinkman dan Insomnia, Universitas Klabat Airmadidi, Minahasa Utara, *Jurnal Skolastik Keperawatan* Vol. 6, No. 2, pp. 85-93
- Pusparini, P., 2018, Defisiensi Vitamin D terhadap Penyakit (*Vitamin D Deficiency and Diseases*), *Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory*, 21(1), p. 90, doi: 10.24293/ijcpml.v21i1.1265.
- Ratajczak, A. E. *et al.*, 2021, *Impact of Cigarette Smoking on The Risk of Osteoporosis in Inflammatory Bowel Diseases*, *Journal of Clinical Medicine*, 10(7), pp. 1–14, doi: 10.3390/jcm10071515.

- Rimahardika, R., 2016, Asupan Vitamin D dan Paparan Sinar Matahari pada Orang Bekerja di Dalam Ruangan dan di Luar Ruangan, Universitas Diponegoro, pp. 8–25.
- Ross, A. C. *et al.*, 2011, *Calcium Vitamin D, Comptes Rendus Mathematique*, doi: 10.1016/j.crma.2018.11.003.
- Rusmini *et al.*, 2019, Pengaruh Vitamin D3 terhadap Kadar Hemoglobin Tikus Wistar yang Dipapar Asap Rokok, *ARTERI : Jurnal Ilmu Kesehatan*.
- Safna, M., 2016, Kadar Kalsium Darah pada Perokok Aktif, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan: Insan Cendekia Medika, Jombang
- Suryadinata, R. V. dkk, 2017, Profil Vitamin D pada Pasien Asma dan Non-Asma Dewasa di Surabaya, *The Indonesian Journal of Public Health*, 12(1), p. 106, doi: 10.20473/ijph.v12i1.2017.106-117.
- Sutiari, N. K., 2017, Mineral Makro Kalsium Mt Kuliah Dasar Ilmu Gizi, Universitas Udayana
- Syauqy, Ahmad, 2015, Ekspresi Enzim Metabolisme Vitamin D pada Sistem Reproduksi Pria, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Jambi, *JMJ Vol. 3, No. 1*, pp. 1-12
- Uberti, Francesca, Vera Morsanuto and Claudio Molinari, 2017, *Vitamin D in Oxidative Stress and Diseases, INTECH Open Science*. doi: 10.5772/64506
- Utami, Lolita Putri Nanda, 2020, Pengaruh Pemberian Vitamin D3 terhadap Kadar Glukosa Darah pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur Wistar Jantan yang dipapar Asap Rokok, Fakultas Kedokteran Universitas Malahayati, Bandar Lampung
- Widiarsih, C., 2018, Gambaran Kadar Kalsium Darah pada Perokok Aktif di Banjar Taman Desa Adat Tegal Darmasaba Kecamatan Abiansema Kabupaten Badung, 15(2), pp. 1–23.
- Widiastuti, Rendika O., Sofyan Musyabiq Wijaya dan Risti Graharti, 2018, Suplementasi Kalsium selama Kehamilan sebagai Pencegahan Kejadian Preeklampsia, Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, *Majority Vol. 3, No. 3*, pp. 207-210
- Zahra, Nafisah, Andrew Johan dan Dwi Ngestiningsih, 2019, Hubungan antara Kadar Vitamin D dengan Kadar Malondialdehid (MDA) Plasma pada Lansia, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, *JKD Vol. 8, No.1* : 333-342