

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis/Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratorik karena terdapat perlakuan dan kelompok kontrol pada hewan coba tikus Wistar serta menggunakan randomisasi dengan menggunakan desain penelitian *Control Group Post Test Design* yaitu membandingkan hasil yang di dapat setelah perlakuan dengan menggunakan kontrol positif dan kontrol negatif dimana pengujian dilakukan setelah intervensi. Pemilihan objek penelitian untuk pengelompokan dan pemberian perlakuan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), hal ini dikarenakan hewan coba, tempat percobaan dan bahan penelitian lainnya bersifat homogen. Tikus-tikus yang digunakan dalam penelitian ini dibagi menjadi 9 kelompok dan masing-masing kelompok ada 4 ekor tikus, yaitu:

1. Kelompok N : sampel dengan kondisi tidak dipapar asap mesin berbahan bakar bensin, tidak diberi oksigen dan tidak diberi ekstrak etanol kacang tunggak (kontrol negatif).
2. Kelompok N + O₄ : sampel dengan kondisi tanpa paparan asap mesin berbahan bakar bensin namun diberi oksigen 4 menit.
3. Kelompok N + G : sampel dengan kondisi tanpa paparan asap mesin berbahan bakar bensin namun diberi ekstrak etanol kacang tunggak.
4. Kelompok A₂O₄(-)G : sampel dengan paparan asap mesin berbahan bakar bensin selama 2 menit dan oksigen selama 4 menit secara bersamaan dan tidak diberi ekstrak etanol kacang tunggak.

5. Kelompok $A_2O_4(+)$ G : sampel dengan paparan asap mesin berbahan bakar bensin selama 2 menit dan oksigen selama 4 menit secara bersamaan dan diberi ekstrak etanol kacang tunggak.
6. Kelompok $A_3O_4(-)$ G : sampel dengan paparan asap mesin berbahan bakar bensin selama 3 menit dan oksigen selama 4 menit secara bersamaan dan tidak diberi ekstrak etanol kacang tunggak
7. Kelompok $A_3O_4(+)$ G : sampel dengan paparan asap mesin berbahan bakar bensin selama 3 menit dan oksigen selama 4 menit secara bersamaan dan diberi ekstrak etanol kacang tunggak.
8. Kelompok $A_4O_4(-)$ G : sampel dengan paparan asap mesin berbahan bakar bensin selama 4 menit dan oksigen selama 4 menit secara bersamaan dan tidak diberi ekstrak etanol kacang tunggak.
9. Kelompok $A_4O_4(+)$ G : sampel dengan paparan asap mesin berbahan bakar bensin selama 4 menit dan oksigen selama 4 menit secara bersamaan dan diberi ekstrak etanol kacang tunggak.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang menjadi target penelitian ini adalah tikus putih galur Wistar (*Rattus norvegicus*). Sampel penelitian yang digunakan adalah tikus putih galur Wistar dengan kriteria berikut:

a. Kriteria inklusi:

- Tikus jantan berusia 3-4 bulan
- Berat badan sekitar 250-300 gram
- Kondisi badan sehat yang ditandai dengan mata jernih, bulu mengkilap, gerakan aktif dan lincah, dan feses tidak lembek

b. Kriteria eksklusi:

- Tikus yang sakit
- Sebelumnya pernah digunakan untuk eksperimen lain

Sampel yang digunakan adalah tikus jenis *Rattus norvegicus*. Jenis kelamin tikus yang di gunakan adalah tikus jantan yang sehat karena pada tikus betina terdapat hormon estrogen yang mempengaruhi metabolisme lemak dan kolesterol (Julia, dkk 2011).

Jumlah replikasi yang digunakan untuk setiap perlakuan memakai rumus :

$$(t-1)(r-1) \geq 15 \text{ (Hanafiah, 2005)}$$

t = jumlah perlakuan

r = jumlah replikasi

15 = konstanta

Pada penelitian ini jumlah perlakuan adalah 9 (t = 9) sehingga jumlah replikasi adalah:

$$(9-1)(r-1) \geq 15$$

$$8r \geq 23 \quad r \geq 23 : 8 \quad r \geq 2.875$$

Jadi pengulangan yng dibutuhkan untuk setiap perlakuan minimal 3 ekor.

Pada penelitian ini digunakan pengulangan sebesar 4 (n = 4) untuk setiap perlakuan. Total tikus adalah 36 ekor tikus untuk 9 kelompok perlakuan dan kontrol.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah lama paparan asap kendaraan bermotor yang di berikan dalam berbagai dosis waktu.

4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah jumlah sel radang trakea tikus galur Wistar.

4.3.3 Variabel Kendali

Variabel kendali adalah variabel yang dapat dikendalikan oleh peneliti agar obyek penelitian selalu terkontrol dan dalam keadaan homogen. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah:

1. Jenis tikus
2. Umur tikus
3. Jenis kelamin tikus
4. Pemberian diet normal
5. Kondisi lingkungan kandang

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya selama 4 bulan dari bulan Januari sampai bulan April 2012

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah:

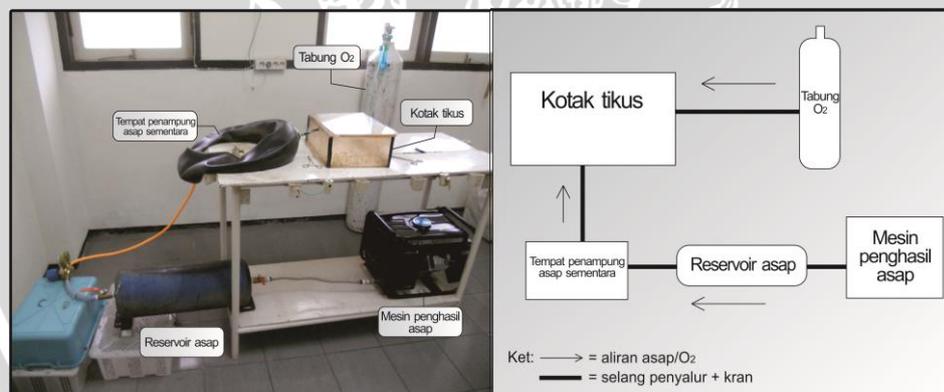
1. Pakan standar yang terdiri dari comfeed PARS 66,67% (dengan kandungan air 12%, protein 11%, lemak 4%, serat 7%, abu 8%, kalsium 1,1%, fosfor 0,9%, antibiotik coccidiostat 53%) dan air 33,33%.

2. Asap yang dipapar berasal dari mesin modifikasi, bahan bakar bensin.
3. Kacang tunggak yang telah diekstraksi.
4. Bahan pengambilan organ.
5. Bahan pembuatan slide histopatologi trakea.

4.5.2 Alat/instrumen Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah sebagai berikut:

1. Mesin untuk pemberian asap buatan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Terdiri atas kotak pengasapan, mesin dengan bahan bakar bensin (w : 1000w, OM : 0.127 gr/kwh), alat pengatur banyak sedikitnya asap, dan tabung oksigen



Gambar 4.1 Mesin Untuk Pemberian Asap Kendaraan

2. Alat pembuat pakan hewan coba: timbangan, neraca analitik, baskom, pengaduk, gelas ukur, penggiling pakan, dan nampan.
3. Alat untuk membuat ekstrak etanol kacang tunggak:
 - a. Oven
 - b. Blender
 - c. Timbangan

- d. Gelas erlenmeyer
 - e. Corong gelas
 - f. Kertas saring
 - g. Labu evaporator
 - h. Labu penampung etanol
 - i. Evaporator
 - j. Pendingin spiral / *rotary evaporator*
 - k. Selang *water pump*
 - l. *Water pump*
 - m. *Water bath*
 - n. *Vacuum pump*
 - o. Botol hasil ekstrak
4. Alat untuk pengambilan organ:
- a. Kotak tertutup
 - b. Kapas yang di basahi eter
 - c. *Scalpel*
 - d. Gunting
 - e. Pinset
 - f. Tabung plastik untuk tempat menyimpan organ sementara sebelum dibuat preparat histopatologi
5. Alat pembuat dan pemeriksaan sediaan histopatologi trakea:
- a. Mikrotom rotat
 - b. *Object glass* dan *cover glass*
 - c. *Automatic tissue processor*
 - d. Pencetak parafin kontrol

4.6 Definisi Operasional

Definisi operasional dari penelitian ini adalah:

- a. Paparan asap : pemaparan dengan menggunakan mesin yang dapat menyalurkan asap hasil pembakaran bahan bakar bensin ke dalam kotak yang diisi tikus-tikus kelompok perlakuan (Gambar 4.1). Lama waktu pengasapan dalam penelitian ini adalah 2 menit, 3 menit, dan 4 menit per hari selama 30 hari.
- b. Ekstrak etanol kacang tunggak : kacang tunggak kering diperoleh jenis KT-6 di Balitkabi (Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi) Malang. Diekstraksi menggunakan metode Maserasi yang hasilnya kemudian diuapkan dari pelarutnya (etanol 95%) menggunakan rotary evaporator. Hasil yang didapat adalah ekstrak kasar kacang tunggak.
- c. Sel radang trakea tikus : adalah sel radang pada lapisan mukosa dan submukosa trakea tanpa membedakan sel radang akut berupa polimorfonuklear sel (neutrofil, eosinofil, basofil) dan sel radang kronik berupa mononuclear sel (limfosit, monosit). Organ trakea di buat preparat histopatologi dengan pengecatan *Hematoxylin Eosin* (HE). Kemudian slide dilakukan pemotretan dengan menggunakan mikroskop digital dot slide. Selanjutnya membaca hasil pemotretan slide dengan *software Olyvia* dihitung dari 20 kali lapangan pandang dengan pembesaran 400x.

Eosinofil: mempunyai granula besar, merah muda cerah memenuhi sitoplasma, nukleus berciri dua lobi kecil atau mungkin ada yang tiga lobi.

Basofil : granula lebih besar dari eosinofil, berwarna biru tua, biasanya menutupi nukleus. Nukleus berlobi dua.

Neutrofil : sitoplasma mengandung granula halus biru atau merah muda. Nukleus terdiri dari beberapa lobi dan dihubungkan oleh suatu benang kromatin.

Limfosit : sitoplasma agranular atau sedikit mengandung granula, nukleus berbentuk bulat, besarnya bervariasi.

Monosit : leukosit yang terbesar, bentuk nukleus bervariasi mulai dari yang bulat, oval atau membentuk ginjal dan berwarna lebih terang dari pada limfosit, kromatin lebih halus dan sitoplasma banyak.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Ekstraksi Kacang Tunggak

Untuk mendapatkan ekstrak etanol kacang tunggak, diperlukan suatu proses ekstraksi. Ekstraksi ini dilakukan dengan metode maserasi. Cara pembuatannya adalah:

1. Proses pengeringan
 - a. Sampel basah (biji kacang tunggak) di cuci bersih.
 - b. Lalu masukan oven dengan suhu 40-60°C atau dengan panas matahari hingga kering (bebas kandungan air).
2. Proses ekstraksi
 - a. Biji kacang tunggak digiling hingga halus.
 - b. Bubuk kacang tunggak ditimbang sebanyak 100 gram.
 - c. Bubuk kacang tunggak dimasukan ke dalam gelas Erlenmeyer ukuran \pm 1 L.

- d. Bubuk kacang tunggak direndam dengan etanol sebanyak 900 mL.
 - e. Kocok sampai bener-bener tercampur (± 30 menit).
 - f. Diamkan 1 malam sampai mengendap.
 - g. Ambil lapisan atas campuran etanol (pelarut) dengan zat aktif yang sudah tercampur (bisa dengan cara penyaringan menggunakan kertas saring).
 - h. Lakukan proses perendaman ini sampai 3 kali.
3. Proses evaporasi
- a. Hasil rendaman dimasukkan dalam labu evaporasi 1 L.
 - b. Labu evaporasi dipasang pada evaporator.
 - c. *Water bath* diisi dengan air sampai penuh.
 - d. Semua rangkaian alat dipasang termasuk *rotary evaporator*, pemanas *water bath* (atur sampai 90°C atau sesuai dengan titik didih pelarut), kemudian disambungkan dengan aliran listrik.
 - e. Larutan etanol dibiarkan menguap pada labu evaporasi.
 - f. Aliran etanol ditunggu hingga berhenti menetes pada labu penampung (± 1,5 sampai 2 jam untuk 1 labu) ± 900 mL.
 - g. Hasil ekstraksi dimasukkan ke dalam botol plastik/kaca.
 - h. Hasil kemudian disimpan didalam *freezer*.

4.7.2 Penentuan Dosis Ekstrak etanol kacang tunggak

Perhitungan didasarkan pada kandungan genistein dalam ekstrak etanol kacang tunggak yaitu:

$$=140.7 \text{ ppm}$$

$$=140.7 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$=140.7 \text{ mg/1000ml}$$

Dalam penelitian ini dosis ekstrak bukan variabel bebas yang bisa diubah-ubah karena variabel bebas adalah lama waktu paparan terhadap asap kendaraan bermotor. Oleh karena itu, digunakan dosis tunggal dalam penelitian ini. Dosis efektif genistein yang dapat menimbulkan efek antioksidan ekstrak adalah 0,5 ml/kgBB. Hal ini didasarkan pada penelitian Christina dan Kintono (2010). Rata-rata berat badan tikus pada kelompok tikus bulan pertama adalah 370 gram.

Genistein yang diperlukan:

$$\frac{370}{1000} \text{ kg} \times 0.5 \text{ mg/kgBB} = 0.185 \text{ mg/tikus/hari}$$

Dosis kacang tunggak:

$$\frac{0.185}{140.7} \text{ mg} \times 1000 \text{ mg} = 1.3 \text{ mg/tikus/hari} \text{ Dijadikan } 2 \text{ ml} \rightarrow \text{ditambah air } 0.7 \text{ ml}$$

4.7.3 Perlakuan Hewan Coba

1. Semua tikus dilihat umur dan ditimbang berat badannya. Dilakukan randomisasi dengan metode RAL agar setiap tikus mempunyai peluang sama untuk mendapatkan perlakuan.
2. Tikus *Rattus norvegicus* galur Wistar dibagi menjadi 9 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor tikus. Pembagian kelompok di lakukan secara acak (*simple random sampling*).

Pembagian kelompok adalah sebagai berikut:

- a. Kelompok kontrol negatif (N): sampel dengan kondisi tidak dipapar asap mesin berbahan bakar bensin, tidak diberi oksigen dan tidak diberi ekstrak etanol kacang tunggak (kontrol negatif).
- b. Kelompok N+O₄: sampel dengan kondisi tanpa paparan asap mesin berbahan bakar bensin namun diberi oksigen 4 menit.

- c. Kelompok N+G: sampel dengan kondisi tanpa paparan asap mesin berbahan bakar bensin namun diberi ekstrak etanol kacang tunggak.
- d. Kelompok $A_2O_4(-)G$: sampel dengan paparan asap mesin berbahan bakar bensin selama 2 menit dan oksigen selama 4 menit secara bersamaan dan tidak diberi ekstrak etanol kacang tunggak.
- e. Kelompok $A_2O_4(+)G$: sampel dengan paparan asap mesin berbahan bakar bensin selama 2 menit dan oksigen selama 4 menit secara bersamaan dan diberi ekstrak etanol kacang tunggak.
- f. Kelompok $A_3O_4(-)G$: sampel dengan paparan asap mesin berbahan bakar bensin selama 3 menit dan oksigen selama 4 menit secara bersamaan dan tidak diberi ekstrak etanol kacang tunggak.
- g. Kelompok $A_3O_4(+)G$: sampel dengan paparan asap mesin berbahan bakar bensin selama 3 menit dan oksigen selama 4 menit secara bersamaan dan diberi ekstrak etanol kacang tunggak.
- h. Kelompok $A_4O_4(-)G$: sampel dengan paparan asap mesin berbahan bakar bensin selama 4 menit dan oksigen selama 4 menit secara bersamaan dan tidak diberi ekstrak etanol kacang tunggak.
- i. Kelompok $A_4O_4(+)G$: sampel dengan paparan asap mesin berbahan bakar bensin selama 4 menit dan oksigen selama 4

menit secara bersamaan dan diberi ekstrak etanol kacang tunggak.

3. Persiapan hewan uji

- a. Tikus ditempatkan dalam kandang terpisah.
- b. Sebelum perlakuan, semua kelompok tikus percobaan diadaptasikan pada kondisi laboratorium tempat percobaan, kandang, waktu makan dan eksplorasi terhadap pakan tikus selama 7 hari. Tiap tikus diberikan pakan standar yang terdiri dari 66% PARS dan 33% terigu sejumlah 40 gram secara ad libitum.

4.7.4 Pemberian Ekstrak etanol kacang tunggak pada Tikus

Pemberian ekstrak etanol kacang tunggak pada kelompok tikus yang akan diberi perlakuan dilakukan 30 menit sebelum perlakuan melalui alat sonde dengan dosis yang sudah ditentukan secara per oral. Sonde di pasang pada ujung spuit lalu dimasukkan ke dalam mulut tikus Wistar sehingga mencapai esophagus bahkan sampai lambung.

4.7.5 Pemaparan Asap Kendaraan Bermotor

Cara pemaparan:

- a. Tikus ditimbang berat badannya dengan neraca Ohaus sebelum pemaparan.
- b. Tempat pemaparan dibersihkan dari kotoran dan asap.
- c. Peralatan yang akan digunakan untuk pemaparan diperiksa terlebih dahulu dan dipastikan dapat berfungsi dengan baik.
- d. Untuk kelompok perlakuan $A_2O_4(+)$ G, $A_3O_4(+)$ G, $A_4O_4(+)$ G sebelum dilakukan pemaparan, tikus diberikan ekstrak etanol kacang tunggak 30 menit sebelumnya.

- e. Selanjutnya dua ekor tikus (satu kelompok perlakuan) dimasukkan kedalam kotak dan segera ditutup. Dalam penelitian ini, satu kelompok perlakuan dibagi menjadi dua tahap pemaparan, masing-masing dua ekor tikus.
- f. Pemaparan asap kendaraan dilakukan dengan cara menyalakan mesin dan kran penyalur asap dan O₂ sesuai dengan waktu yang telah ditentukan untuk masing-masing kelompok perlakuan (hingga maksimal 4 menit).
- g. Setelah itu mesin dan kran penyalur dimatikan, lalu tutup kotak dibuka dan tikus dipindahkan ke kandang semula.
- h. Setiap pemaparan asap kendaraan berikutnya, kotak selalu dibersihkan lebih dulu dari sisa asap kendaraan sebelumnya.

4.7.6 Pengambilan Organ Trakea Tikus

Bahan:

1. Eter
2. Kapas
3. Formalin 10%

Alat:

1. Alat bedah minor
2. Tabung sebagai tempat sementara pengawetan organ
3. Kotak tertutup

Cara kerja:

1. Hewan coba tikus dianastesi dengan cara dimasukkan kedalam kotak yang berisi kapas yang telah dituangi eter.
2. Tikus dimatikan dengan prosedur anastesi umum menggunakan eter.
3. Tikus dibedah dan diambil jaringan trakeanya.

4. Trakea yang telah diambil kemudian diletakan dalam kotak sementara dan difiksasi dengan formalin 10%.
5. Trakea selanjutnya siap untuk dibuat preparat histologi.

4.7.7 Pembuatan Sediaan Histopatologi Trakea Tikus

Bahan:

1. Formalin 10%
2. Cat Hematoksilin-Eosin (HE)
3. Xylol
4. *Counter staining*
5. *Canadian balsem* atau *Entellan*
6. Sediaan trakea tikus
7. Parafin lunak
8. Parafin keras
9. Alkohol asam
10. Ammonium
11. Aquades
12. Alkohol dengan berbagai konsentrasi yang diperlukan

Alat:

1. Mikrotom
2. *Object glass*
3. *Cover glass*

Cara kerja:

A. Proses persiapan

1. Tikus dimatikan dengan prosedur anestesi umum menggunakan eter.
2. Setelah mati, trakea dikeluarkan dari tubuh tikus.

3. Potongan trakea dimasukkan ke dalam tabung organ yang berisi larutan formalin 10% dan direndam.
4. Masing-masing tabung diberi indentitas sesuai dengan kelompok perlakuan.

B. Proses pembuatan sediaan

1. Setelah direndam, jaringan trakea didehidrasi dengan merendamnya pada alkohol dengan konsentrasi bertingkat, yaitu konsentrasi 30%, 50%, 70%, 95% dan dua kali alkohol absolut. Semua perendaman pada fase dehidrasi ini dilakukan masing-masing selama 30 menit.
2. Setelah semua proses perendaman selesai, dilanjutkan dengan proses *clearing*, yaitu dengan merendam sediaan pada xylol sebanyak 2 kali masing-masing selama 1 jam.
3. Lalu dilakukan proses infiltrasi dengan parafin lunak pada suhu 42-46°C selama dua kali satu jam.
4. Dilakukan *blocking* dengan parafin keras pada suhu 46-52°C selama satu jam.
5. Kemudian di sliding pada mikrotom *rotary* dengan ukuran 4-6mm.
6. Dipanaskan dengan suhu 60°C.
7. Dilakukan deparafinasi dengan perendaman jaringan pada cairan xylol selama dua kali lima menit.
8. Selanjutnya dilakukan perendaman dalam alkohol bertingkat dengan ukuran konsentrasi terbalik mulai dari alkohol 95%, 85%, 75%, 50%, 30% dan terakhir dengan aquades selama 3 menit.
9. Terakhir dilakukan pewarnaan dengan HE sebagai berikut:

- a. Pemberian HE 15 menit.
- b. Direndam pada alkohol asam selama 3-10 detik.
- c. Diberi cairan ammonium selama 3-10 detik.
- d. Pemberian *counter staining* selama 15-20 detik.
- e. Didehidrasi pada alkohol bertingkat (50%, 70%, 85%, 90%, dua kali alkohol bebas).
- f. Pemberian xylol 5 menit.
- g. Dilakukan *mounting* menggunakan Entellan.
- h. Sediaan sel diamati dengan mikroskop dan dibuat dokumentasi dengan kamera.

4.7.8 Perhitungan Jumlah Sel Radang

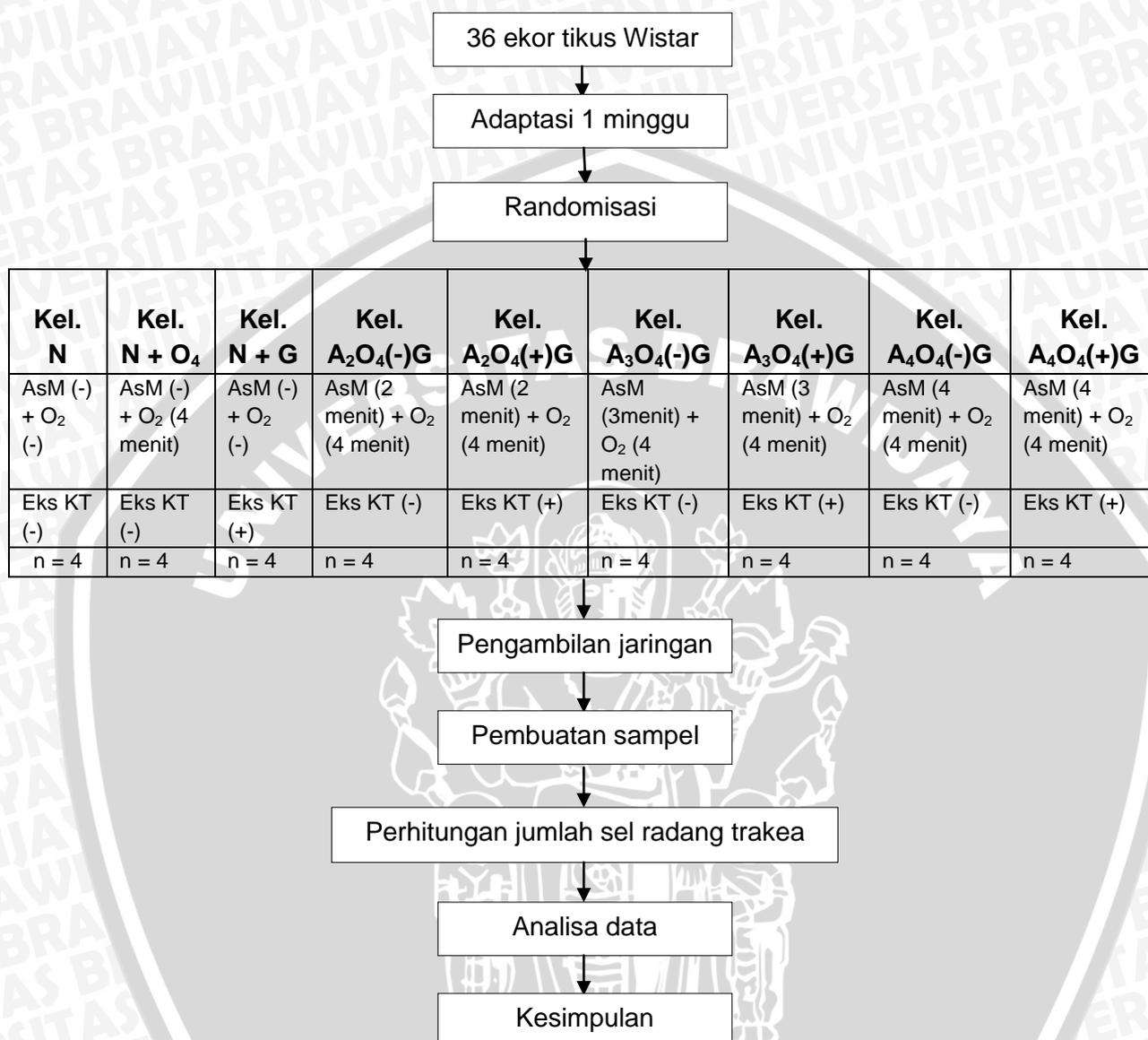
Data jumlah sel radang trakea tikus didapatkan melalui pengamatan pada sediaan histopatologi trakea tikus dengan pengecatan HE yang dihitung menggunakan gambaran hasil *scan dot* yang dihasilkan dengan program *OlyVIA* (*Olympus Viewer for Imaging Applications*) yang tersedia di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada 20 lapangan pandang dengan perbesaran 400 kali. Perhitungan sel radang dilakukan dengan menghitung jumlah semua sel radang yang terdapat pada lapisan mukosa dan submukoasa trakea tikus tanpa membedakan jenis sel radangnya.

4.8 Pengolahan dan Analisis Data

Data hasil perhitungan sel radang trakea tikus masing-masing kelompok perlakuan dilihat rata-ratanya disajikan dalam bentuk tabel kemudian dianalisis secara statistik dengan bantuan software *SPSS 17.00 for Windows* dengan derajat kepercayaan 95% dengan $\alpha = 0,05$. Jadi, hasil uji statistik dinyatakan bermakna bila $p < 0,05$. langkah-langkahnya adalah sebagai berikut:

1. Menilai distribusi normalitas data secara analitis dengan uji *Kolmogorov-Smirnov* atau *Shapiro-Wilk*. Uji *Kolmogorov-Smirnov* digunakan untuk sampel yang besar (lebih dari 50) sedangkan *Shapiro-Wilk* untuk sampel yang sedikit (kurang atau sama dengan dari 50).
2. Uji homogenitas untuk menilai atau menguji apakah data yang diperoleh dari setiap kelompok memiliki varian homogen. Jika varians data homogen, maka hasil dapat dilanjutkan dengan uji *One Way Analysis of Variance* (ANOVA). Karena syarat untuk kelompok tidak berpasangan adalah varians data harus sama ($p > 0,05$), dan apabila data tidak homogen, digunakan uji *Kruskal-Wallis*.
3. uji *Kruskal-Wallis* digunakan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan kelompok-kelompok perlakuan dan membandingkan rata-rata masing-masing kelompok tersebut.
4. Apabila dari uji tersebut terdapat perbedaan, maka dapat dilakukan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui letak perbedaan dari 9 perlakuan yang telah diberikan.
5. Selanjutnya dilakukan uji korelasi Spearman's Rho yang bertujuan untuk menentukan besarnya pengaruh dan arah korelasi antara lama paparan asap kendaraan bermotor terhadap jumlah sel radang trakea tikus . Dalam penelitian ini, besar interval kepercayaan yang dipakai adalah 95% ($\alpha = 0,05$).

4.9 Alur Penelitian



Keterangan:

- AsM = Asap mesin kendaraan bermotor
- Eks KT = Ekstrak etanol kacang tunggak
- N = Normal (kontrol negatif)
- N+O₄ = Normal + oksigen 4 menit.
- N+G = Normal + ekstrak etanol kacang tunggak.
- A₂O₄(-)G = asap 2 menit + oksigen 4 menit tanpa ekstrak etanol kacang tunggak.
- A₂O₄(+)G = asap 2 menit + oksigen 4 menit + ekstrak etanol kacang tunggak.
- A₃O₄(-)G = asap 3 menit + oksigen 4 menit tanpa ekstrak etanol kacang tunggak.
- A₃O₄(+)G = asap 3 menit + oksigen 4 menit + ekstrak etanol kacang tunggak.
- A₄O₄(-)G = asap 4 menit + oksigen 4 menit tanpa ekstrak etanol kacang tunggak.
- A₄O₄(+)G = asap 4 menit + oksigen 4 menit + ekstrak etanol kacang tunggak.

