

**EFEK ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOL *BULBUS BAWANG DAYAK*
(*Eleutherine americana* Merr.) TERHADAP STRUKTUR MIKROANATOMI
TUBULUS SEMINIFERUS TESTIS TIKUS YANG DIPAPAR ASAP ROKOK**

**Antioxidant Effect of *Eleutherine Americana* Merr (*Bawang Dayak*) Ethanol Extract
Towards the Tubule Seminiferous Microanatomy Structure Testis of Male Rats
Exposed to Cigarette Smoke.**

Ernawati, Anni Nurliani

Program Studi Biologi FMIPA Universitas Lambung Mangkurat
Jl. A. Yani Km 35,8 Banjarbaru, Kalimantan Selatan

ABSTRAK

*Radikal bebas telah diketahui mengganggu spermatogenesis yang terjadi di dalam testis. Indikator terjadinya gangguan proses spermatogenesis adalah penurunan jumlah sel spermatogenik dan ukuran diameter tubulus seminiferus testis. Telah dilakukan penelitian untuk mengetahui efek antioksidan ekstrak etanol bulbus bawang dayak (*Eleutherine americana* Merr.) terhadap struktur mikroanatomi tubulus seminiferus testis tikus jantan yang dipapar asap rokok. Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap dengan 5 perlakuan, yaitu P0 (kelompok tanpa perlakuan), P1 (kelompok yang hanya diberi paparan asap rokok), P2 (kelompok perlakuan dengan paparan asap rokok setelah pemberian ekstrak etanol bulbus bawang dayak dengan dosis 30,00 mg/KgBB), P3 (dosis 60,00 mg/KgBB), dan P4 (90,00 mg/KgBB), setiap perlakuan menggunakan 4 kali ulangan. Sebanyak 20 ekor tikus jantan berusia 2-3 bulan dengan berat 150-200 gram digunakan sebagai hewan uji. Perlakuan diberikan secara oral, setiap tikus dicekoki 2,00 mL dosis yang telah diencerkan dengan Na-CMC (Sodium Carboxymethylcellulose) 0,5% setiap hari selama 53 hari. Pada hari ke-54 dilakukan pembedahan untuk mengambil organ testis tikus tersebut, selanjutnya dibuat sediaan mikroanatomi dengan metode parafin dan pewarnaan Hematoksilin Eosin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol bulbus bawang dayak dengan dosis 60,00 dan 90,00 mg/KgBB dapat meningkatkan jumlah sel spermatid dari 3,00 menjadi 3,36 yang menurun akibat radikal bebas asap rokok.*

Kata kunci : Antioksidan, *Eleutherine americana*, radikal bebas, tubulus seminiferus

ABSTRACT

*Free radicals have been known to interfere with spermatogenesis occurring in the testes. Indicators of disturbance spermatogenesis process are the decline in the number of spermatogenic cells and diameter of testicular seminiferous tubule. The research was conducted to determine the antioxidant effects of bulbus ethanol extract of bawang dayak (*Eleutherine americana* Merr.) on the tubule seminiferous microanatomy structure testis of male rats exposed to cigarette smoke. The research using completely randomized design with 5 treatments, namely P0 (group without treated), P1 (group with cigarette smoke exposure only), P2 (the group treated with cigarette smoke exposure after giving of bulbus ethanol extract of bawang dayak with a dose of 30.00 mg/kg), P3 (a dose of 60.00 mg/kg), and P4 (a dose of 90.00 mg/kg), each treatment using 4 replications. It is used 20 male rats aged 2-3 months, weighing 150-200 grams. Treatment was given orally, each rat fed 2.00 mL dose has been diluted with Na-CMC 0,5% daily for 53 days. On the 54th day of surgery to take the organ testis rat, then made preparations microanatomy with paraffin method and staining with Haematoxyline Eosine method. The result of this research showed that bulbus ethanol extract of bawang dayak at a dose of 60.00 and 90.00 mg/kgBB increased the number of spermatid cells from 3.00 become 3.36, which declining due to free radicals from cigarette smoke.*

Key words : Antioxidants, *Eleutherine americana*, free radicals, tubules Seminiferous

PENDAHULUAN

Rokok merupakan sumber utama radikal bebas yang berasal dari lingkungan. Menurut Organisasi Kesehatan Dunia (WHO), lingkungan asap rokok adalah penyebab berbagai penyakit dan juga dapat mengenai orang sehat yang bukan perokok (perokok pasif). Salah satu gangguan kesehatan yang disebabkan oleh rokok ialah gangguan pada sistem reproduksi (Intania, 2006). Penelitian Sukmaningsih (2009) menyatakan terjadi penurunan jumlah spermatosit pakiten dan spermatid tubulus seminiferus testis pada mencit yang dipaparkan asap rokok. Hasil penelitian Subekti (2006) juga menunjukkan bahwa mencit yang diberi paparan asap rokok memiliki proses spermatogenesis yang kurang lengkap.

Spermatogenesis merupakan proses yang sangat kompleks, pada tahap ini spermatogonia berkembang menjadi spermatozoa. Kandungan nikotin pada rokok diketahui mengganggu spermatogenesis karena menghambat sel Leydig sehingga menyebabkan penurunan kadar sekresi hormon testosteron (Pacifci, *et al.*, 1993). Penurunan hormon testosteron menyebabkan terlepasnya spermatid dari sel sertoli ke lumen tubulus, sehingga spermatid terhambat untuk berdiferensiasi menjadi spermatozoa (Guven, *et al.*, 1999). Dampak negatif radikal bebas terhadap kesehatan reproduksi bisa diatasi dengan pemberian antioksidan.

Salah satu tumbuhan yang berpotensi sebagai antioksidan adalah bawang dayak (*Eleutherine americana*). Tumbuhan ini umumnya digunakan oleh masyarakat pedalaman sebagai obat atau ramuan tradisional. Kandungan yang terdapat dalam bawang dayak terdiri dari senyawa alkaloid, glikosida, flavonoid, fenolik, saponin, triterpenoid, tannin, steroid dan kuinon (Firdaus, 2006). Senyawa yang terdapat di dalam bawang dayak sangat potensial sebagai tanaman obat modern. Penelitian Kuntorini & Astuti (2009) membuktikan adanya aktivitas antioksidan yang kuat pada ekstrak etanol *bulbus* bawang dayak dengan nilai IC_{50} sebesar 25,33 $\mu\text{g/ml}$.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui daya antioksidan ekstrak etanol *bulbus* bawang dayak dalam menangkal radikal bebas yang ditimbulkan dari asap rokok dan mengetahui pengaruhnya dalam mencegah gangguan spermatogenesis dan melindungi struktur mikroanatomi tubulus seminiferus testis tikus yang dipapar asap rokok dari kerusakan. Menurut Andriawati (2009), terjadinya gangguan pada tubulus seminiferus dapat dilihat dari perubahan struktur mikroanatomiya meliputi penurunan jumlah sel spermatogenik yaitu spermatogonium, spermatosit primer, spermatosit sekunder, spermatid dan spermatozoa, serta ukuran diameter tubulus seminiferus.

METODOLOGI

Pembuatan Ekstrak

Bulbus bawang dayak diekstraksi dengan cara maserasi dengan pelarut etanol. Sampel serbuk *bulbus* bawang dayak ditimbang 500 gram, dimasukkan ke dalam alat maserasi dan ditambahkan etanol secara perlahan sambil diaduk hingga cairan penyari merendam 1 cm di atas permukaan sampel. Ekstraksi dilakukan selama 3 x 24 jam, pergantian pelarut dilakukan sehari sekali. Pelarut diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu pemanasan 40°C sampai pelarut tidak menguap lagi. Filtrat diuapkan kembali di atas *waterbath* dan ditimbang hingga beratnya konstan sehingga dihasilkan 12 g ekstrak etanol *bulbus* bawang dayak dari 500 gram sampel yang dimaserasi.

Sumber radikal bebas

Sumber radikal bebas yang digunakan berasal dari asap rokok. Jenis rokok yang digunakan adalah tembakau dengan kadar nikotin 2,4 mg dan kadar tar 38 mg. Pemaparan dengan asap rokok dilakukan 1 kali sehari sebanyak satu batang untuk masing-masing kelompok yang dimasukkan ke dalam kotak berukuran 30x22x19 cm yang telah diberi ventilasi secukupnya (Anggraini, 2006). Setelah pemaparan mencit dikembalikan pada kandang masing-masing secara berkelompok.

Penentuan peringkat dosis

Penentuan dosis ini didasarkan atas penelitian Yurindani (2010), yang

menyatakan bahwa ekstrak *bulbus* bawang dayak bersifat toksik terhadap jumlah sel darah tikus pada dosis 100 dan 200,00 mg/KgBB. Oleh karena itu, penggunaan peringkat dosis yang dianggap aman pada penelitian ini adalah 30,00 mg/KgBB; 60,00 mg/KgBB; dan 90,00 mg/KgBB.

Pengelompokan dan perlakuan hewan uji

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 variabel perlakuan dan 4 kali ulangan untuk masing-masing perlakuan.

P_0 = Kelompok tanpa perlakuan

P_1 = Kelompok perlakuan yang hanya diberi paparan asap rokok

P_2 = Kelompok perlakuan dengan paparan asap rokok dan diberi ekstrak *bulbus* bawang dayak dengan dosis 30,00 mg/KgBB secara oral

P_3 = Kelompok perlakuan dengan paparan asap rokok dan diberi ekstrak *bulbus* bawang dayak dengan dosis 60,00 mg/KgBB secara oral

P_4 = Kelompok perlakuan dengan paparan asap rokok dan diberi ekstrak *bulbus* bawang dayak dengan dosis 90,00 mg/KgBB secara oral

Perlakuan berlangsung selama 53 hari, pemaparan asap rokok dilakukan pada sore hari dan pemberian dosis ekstrak etanol *bulbus* bawang dayak pada pagi hari sebanyak 2,00 mL. Pada hari ke-54 tikus diterminasi, testisnya diambil untuk dibuat sediaan mikroskop anatomi tubulus

seminiferus testis dengan metode parafin dan pewarnaan Hematoksilin Eosin (Direktorat Bina Kesehatan Hewan, 1999).

Pengamatan

Pengamatan mikroanatomi meliputi lapisan sel-sel spermatogenik yaitu spermatogonium, spermatosit primer, spermatosit sekunder, spermatid dan spermatozoa dari *lamina basalis* ke arah lumen *tubuli seminiferi* dan keadaan sel-sel spermatogenik di dalam *tubuli seminiferi*. Pengamatan dilakukan pada *tubuli seminiferi* yang terpotong bundar dan diambil secara acak. Perhitungan dilakukan pada 3 tubuli dan untuk setiap tubulus diambil 4 data yang diperoleh dari bagian atas kanan, atas kiri, bawah kanan dan bawah kiri. Perhitungan spermatozoa pada lumen tubulus mengikuti cara Johnsen, 1970, dalam Wardoyo, dkk., 1987 yaitu :

- Nilai 3 : Bila jumlah spermatozoa penuh.
- Nilai 2 : Bila jumlah spermatozoa adalah setengah penuh.
- Nilai 1 : Bila jumlah spermatozoa adalah sepertiga penuh atau kurang, sampai tidak ditemukan spermatozoa di dalam lumen tubulus.

Penilaian dan pengamatan mikroskopis dilakukan pada pembesaran 400x. Skor dari lapangan pandang dirata-rata, sehingga didapatkan skor untuk masing-masing tikus. Lalu digabungkan untuk menjadi rerata skor kelompok.

Analisis Data

Peningkatan maupun penurunan jumlah lapisan sel-sel spermatogenik pada *tubulus seminiferus* kelompok uji dapat diketahui dengan membandingkannya dengan hasil dari kelompok kontrol. Data kuantitatif yang diperoleh dalam penelitian ini diolah secara statistik dan disajikan dalam bentuk mean (rerata) dan standar deviasi. Data yang diperoleh berdistribusi normal dan homogen sehingga dilakukan pengujian dengan uji sidik ragam atau ANOVA $\alpha = 0,05$ untuk mengetahui adanya perbedaan nyata. Karena dengan uji ini terdapat beda nyata kemudian dilakukan uji Duncan untuk mengetahui letak perbedaan antar perlakuan (Sokal & Rohlf, 1996).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan parameter jumlah lapisan sel spermatogenik pada tubulus seminiferus mulai dari *lamina basalis* ke arah lumen dan diameter tubulus seminiferus testis tikus yang diberi ekstrak etanol *bulbus* bawang dayak setelah dipapar asap rokok setiap hari selama 53 hari disajikan dalam bentuk rerata dan standar deviasi (Tabel 1).

Hasil analisis data perhitungan jumlah lapisan sel spermatogenik dan diameter tubulus seminiferus testis dengan uji ANOVA $\alpha = 0,05$ menunjukkan adanya perbedaan nyata hanya pada jumlah sel spermatid.

Tabel 1. Rerata dan standar deviasi diameter (μm) dan jumlah sel spermatogenik tubulus seminiferus testis tikus yang dipapar asap rokok setelah pemberian ekstrak etanol *bulbus* bawang dayak sebagai antioksidan selama 53 hari.

Perlakuan	Diameter Tubulus Seminiferus (μm)	Jumlah Lapisan Sel			Spermatozoa
		Spermatogonium	Spermatosit Primer	Spermatid	
P0	302,50 $\pm$ 11,36 _a	1,43 $\pm$ 0,104 _a	1,54 $\pm$ 0,159 _a	3,68 $\pm$ 0,275 _a	2,41 $\pm$ 0,165 _a
P1	285,62 $\pm$ 8,26 _a	1,29 $\pm$ 0,107 _a	1,31 $\pm$ 0,104 _b	3,00 $\pm$ 0,117 _c	2,08 $\pm$ 0,165 _b
P2	289,38 $\pm$ 8,26 _a	1,31 $\pm$ 0,104 _a	1,33 $\pm$ 0,068 _{ab}	3,22 $\pm$ 0,275 _{bc}	2,16 $\pm$ 0,190 _{ab}
P3	295,62 $\pm$ 5,90 _a	1,37 $\pm$ 0,048 _a	1,43 $\pm$ 0,157 _{ab}	3,43 $\pm$ 0,196 _{ab}	2,24 $\pm$ 0,165 _{ab}
P4	297,50 $\pm$ 11,36 _a	1,41 $\pm$ 0,117 _a	1,45 $\pm$ 0,144 _{ab}	3,56 $\pm$ 0,157 _{ab}	2,33 $\pm$ 0,269 _{ab}

Keterangan :

1. n setiap perlakuan = 4
2. Angka yang diikuti oleh huruf yang sama adalah berbeda tidak nyata ($\alpha=5\%$)
3. P0 : Kelompok tanpa perlakuan
 P1 : Kelompok yang hanya diberi paparan asap rokok
 P2 : Kelompok perlakuan dengan paparan asap rokok dan diberi ekstrak *bulbus* bawang dayak dengan dosis 30 mg/KgBB secara oral
 P3 : Kelompok perlakuan dengan paparan asap rokok dan diberi ekstrak *bulbus* bawang dayak dengan dosis 60 mg/KgBB secara oral
 P4 : Kelompok perlakuan dengan paparan asap rokok dan diberi ekstrak *bulbus* bawang dayak dengan dosis 90 mg/KgBB secara oral.

Hal ini diketahui karena didapat nilai signifikansi 0,003 yang bernilai lebih kecil dari taraf kemaknaan. Kemudian dilanjutkan dengan uji Duncan untuk mengetahui letak perbedaan antar perlakuan, sehingga diketahui bahwa jumlah spermatid P0, P3 dan P4 berbeda nyata terhadap jumlah spermatid P1.

Jumlah spermatogonium dan ukuran diameter tubulus seminiferus pada P2, P3, dan P4 menunjukkan perbedaan yang tidak nyata dengan P0 dan P1 karena nilai signifikansi lebih besar dari taraf kemaknaan ($P>0,05$). Perbedaan secara nyata terlihat pada jumlah spermatisit, spermatid dan spermatozoa kelompok yang hanya diberi perlakuan asap rokok (P1) dibandingkan dengan kelompok tanpa perlakuan (P0). Hal ini dikarenakan adanya gangguan dari radikal bebas

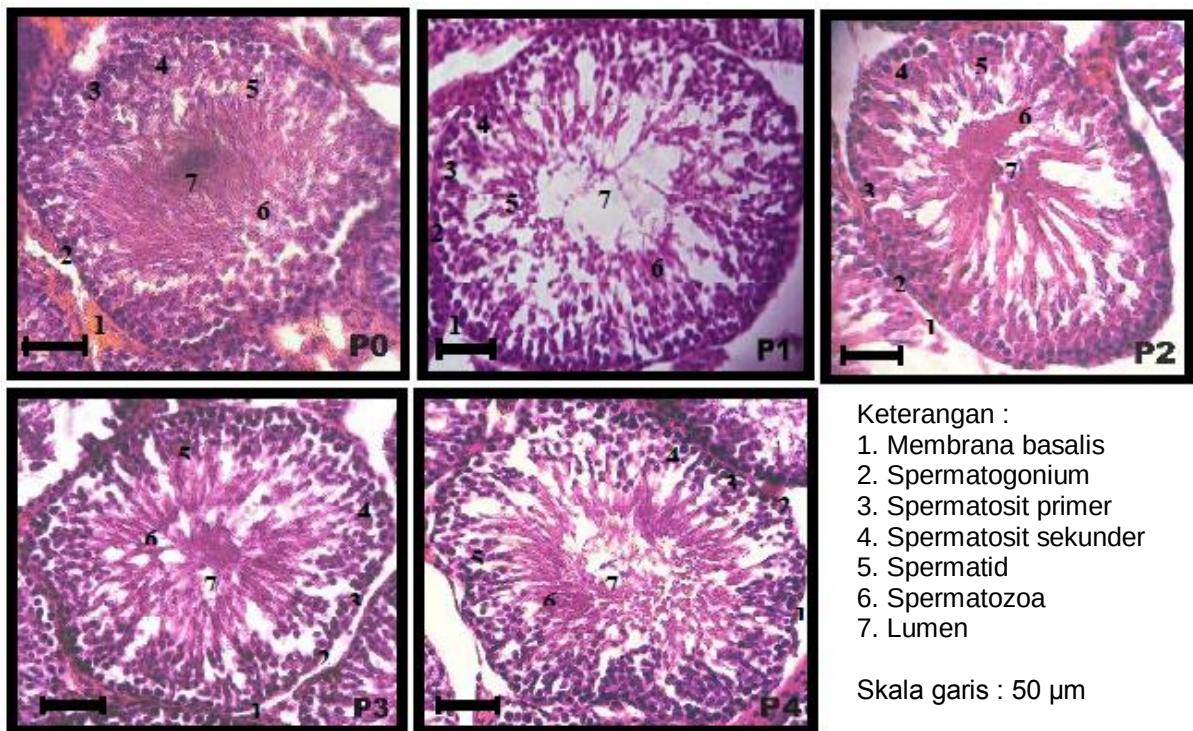
terhadap spermatogenesis di dalam tubulus seminiferus yang menghambat pembelahan sel ataupun kemampuan sel untuk berdiferensiasi sehingga berpengaruh pada jumlah sel spermatisit, spermatid dan spermatozoa di dalam tubulus seminiferus testis.

Struktur mikroanatomi tubulus seminiferus testis yang normal akan menunjukkan asosiasi sel spermatogenik tersusun berlapis sesuai dengan tingkat perkembangannya dari membran basalis menuju ke arah lumen tubulus yakni spermatogonia, spermatisit, dan spermatid. Lumen tampak terisi penuh oleh spermatozoa sebagaimana yang ditunjukkan pada P0, P2, P3 dan P4. Kelompok tanpa perlakuan P2, P3 dan P4 memperlihatkan struktur tubulus seminiferus tampak normal dengan

susunan sel yang rapat dan kompak, serta terlihat perkembangan sel spermatogenik mulai dari membran basalis ke arah lumen yaitu spermatogonia, spermatosit primer, spermatosit sekunder, spermatid dan spermatozoa.

Mekanisme kerja radikal bebas yang terkandung di dalam paparan asap rokok menyebabkan terjadinya penurunan kadar hormon testosteron. Yardimci (1997) dan Yamamoto (1998) menyatakan bahwa testosteron adalah hormon utama yang

diproduksi oleh sel leydig sebagai hasil rangsangan Luteinizing Hormon (LH) dari hipofisis anterior, yang sangat dibutuhkan dalam spermatogenesis. Hormon testosteron berfungsi mengontrol spermatogenesis pada pembelahan meiosis dan juga spermiogenesis, penurunan kadar testosteron tentunya akan mengakibatkan spermatogenesis yang terjadi di dalam tubulus seminiferus testis berjalan tidak normal.



Gambar 1. Struktur mikroanatomi tubulus seminiferus testis tikus jantan yang dipapar asap rokok setelah pemberian ekstrak etanol *bulbus* bawang dayak sebagai antioksidan selama 53 hari. (P0) kelompok tanpa perlakuan; (P1) kelompok perlakuan yang hanya diberi paparan asap rokok; (P2) kelompok perlakuan dengan paparan asap rokok dan diberi ekstrak *bulbus* bawang dayak dengan dosis 30 mg/KgBB secara oral; (P3) kelompok perlakuan dengan paparan asap rokok dan diberi ekstrak *bulbus* bawang dayak dengan dosis 60 mg/KgBB secara oral; dan (P4) kelompok perlakuan dengan paparan asap rokok dan diberi ekstrak *bulbus* bawang dayak dengan dosis 90 mg/KgBB secara oral. Penampang: melintang; Tebal irisan: 4 mikron; Perbesaran mikroskop: 400 $\times$; Pewarnaan menggunakan Haematoksilin-Eosin.

Aktivitas antioksidan dari ekstrak bulbus bawang dayak kemungkinan disebabkan karena kandungan senyawa flavonoid dan kadar fenolik total yang cukup tinggi. Belum diketahui dengan pasti bagaimana mekanisme kerja dari bahan aktif yang terkandung dalam bulbus bawang dayak, sehingga dapat melindungi struktur mikroanatomi tubulus seminiferus dan jumlah sel spermatogenik didalamnya dari kerusakan akibat radikal bebas dari asap rokok.

Diduga hal ini karena senyawa fenolat mampu beresonansi membuat formasi radikal fenoksil dan struktur resonansi yang mungkin dari turunan asam sinamat dan turunan asam benzoat, sehingga membentuk ikatan senyawa radikal antioksidan yang lebih stabil dan tidak berbahaya bagi sel tubuh (Prior & Schaich, 2005).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat diambil kesimpulan

bahwa pemberian ekstrak etanol *bulbus* bawang dayak (*E. americana*) dapat meningkatkan jumlah sel spermatid yang mengalami penurunan akibat radikal bebas dari paparan asap rokok. Pemberian dosis ekstrak etanol *bulbus* bawang dayak (*E. americana*) dengan dosis 60 mg/KgBB dan 90 mg/KgBB dapat meningkatkan jumlah sel spermatid yang menurun akibat radikal bebas dari paparan asap rokok.

DAFTAR PUSTAKA

Andriawati, F. 2009. *Efek Amfetamin Terhadap Spermatogenesis Mencit*. http://biologyonly.com/2009/09/efek-amfetaminterhadapspermatogenesis_02.html

Diakses tanggal 28 Januari 2011

Anggraini, D. 2006. *Pengaruh Pemberian Vitamin E Terhadap Motilitas Spermatozoa Mencit Jantan Strain Balb/C yang diberi Paparan Asap Rokok*. Artikel Karya Tulis Ilmiah. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang.

Direktorat Bina Kesehatan Hewan. 1999. *Manual Standar Metoda Diagnosa Laboratorium Kesehatan Hewan*. Direktorat Bina Kesehatan Hewan, Direktorat Jendral Peternakan dan Departemen Pertanian, Jakarta.

Firdaus, R. 2006. *Telaah Kandungan Kimia Ekstrak Metanol Umbi Bawang Tiwai (Eleutherine americana (Aubl.) Merr.)*. Skripsi. Institut Teknologi Bandung, Bandung.

Guyen, M.C., B. Can, A. Ergun, Y. Saran, and Aydos. 1999. Ultrastructure Effect of Cigarette Smoke on Rat testis. *European Urology* 36 : 645 -649.

Intania, I. 2006. *Pengaruh Pemberian Vitamin C Terhadap Spermatogenesis Mencit Jantan Strain Balb/C Yang Diberi Paparan Asap Rokok*. Undergraduate thesis, Faculty of Medicine.

Kuntorini, E.M dan Astuti, M.D. 2009. *Penentuan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Bulbus Bawang Dayak (Eleutherine americana Merr.)*. FMIPA Universitas Lambung Mangkurat, Banjarbaru.

Pacifici, R., I. Altieri, L. Gandini, A. Lenzi, Simena, and P. Zuccaro. 1993. Nicotine, Cotinine and Trans -3- Hydroxycotinine Levels in Seminal Plasma of Smpkers. Effect on Sperm Parameters. *Therapeutic Drug Monitoring*. 15 : 358 – 363.

Prior, R. L. and K. Schaich, 2005. Standardized Methods for The Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary. *Journal Agric Food Chemistry*, 9 (2).

Sokal, R.R. and Rohlf, F.J. 1996. *Pengantar Biostatistika*. Edisi ke-2 Terjemahan Nasrullah. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.

Subekti, S.U. 2006. *Pengaruh Pemberian Vitamin E Terhadap Proses Spermatogenesis Mencit Jantan Strain Balb/C Yang Diberi paparan Asap Rokok*. KTI. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang

Sukmaningsih. 2009. Penurunan Jumlah Spermatisit Pakiten dan Spermatid Tubulus Seminiferus Testis pada Mencit (*Mus musculus*) yang Dipaparkan Asap Rokok. *Jurnal Biologi* 8 (2) : 31–35.

Wardoyo, B.P.E., W.A Djatmiko, H. Fuad, H. Studiawan dan Suswini. 1987. Profil

aktivitas Biologis Buah Pare. Seminar Nasional Produk Alami Bioaktif, Bandung.

Yamamoto, Y., E. Isoyama, N. Sofikitis, dan I. Miyagawa. 1998. Effect of Smoking on Testicular Function and Fertilizing Potential in Rats. *Urol Res*. 26 : 45 -48.

Yardimci, S., A. Atan, T. Delibasi, K. Sunguroglu, and M. C. Guven. 1997. Long Term effect of Cigarette Smoke Exposure on Plasma Testosterone, Lutenizing Hormone and Follicle Stimulating Hormone Levels in Male Rats. *Br J Urol*. 79 (9) : 66 – 9.

Yurindani, F.S. 2010. *Uji Toksisitas Ekstrak Metanol Bulbus Bawang Dayak (Eleutherine palmifolia) pada Jumlah Sel Darah Tikus Galur Wistar (Rattus norvegicus)*. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lambung Mangkurat, Banjarbaru. Tidak dipublikasikan.