

## UJI TOKSISITAS DAN PERUBAHAN STRUKTUR MIKROANATOMI INSANG IKAN NILA LARASATI (*Oreochromis niloticus*) YANG DIPAPAR TIMBAL ASETAT

FAM Mulyani ✉ P Widiyaningrum, NR Utami

Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Negeri Semarang, Indonesia

### Info Artikel

*Sejarah Artikel:*

Diterima 28 Januari 2014  
Disetujui 15 Maret 2014  
Dipublikasikan April 2014

*Keywords:*

*microanatomy gill structure; nila larasati; test of toxicity*

### Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui Nilai  $LC_{50-96}$  jam pada uji toksisitas ikan Nila Larasati yang dipapar timbal; mengetahui perubahan struktur mikroanatomi dan mengetahui pada konsentrasi berapa timbal menyebabkan perubahan struktur mikroanatomi insang. Sampel uji toksisitas sebanyak 120 ekor untuk mengetahui tingkat kematian ikan hingga 50% dalam 96 jam, dan uji perlakuan sebanyak 80 ekor dengan konsentrasi 0 ppm; 259,51 ppm; 291,94 ppm; dan 324,38 ppm. Pada akhir minggu ke empat diambil sampel insang dan dilakukan analisis gambaran struktur mikroanatomi insang secara deskriptif. Hasil analisis menunjukkan kerusakan edema 0%-25%, fusi lamela antara 1%-75%, hiperplasia 0%-50%, *epithelial lifting* 0%-50%, dan nekrosis 0%-50%. Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa nilai  $LC_{50-96}$  jam pada uji toksisitas ikan Nila Larasati sebesar 324,38 ppm dan mulai terjadi perubahan struktur mikroanatomi insang pada konsentrasi 259,51 ppm.

### Abstract

*The objective of the study was to determine the value of  $LC_{50-96}$  hours in a toxicity test of Nila Larasati fish exposed to lead acetate; to determine the changes in the microanatomy structure and to determine the concentration of lead acetate which causes microanatomy structure changes in the gills of Nila Larasati fish. The samples were 120 fish to find out the 50% fish mortality within 96 hours, and 80 fish in treatment test with the lead acetate concentrations of 0 ppm; 259.51 ppm; 291.94 ppm; and 324.38 ppm. At the end of the 4th week of the research, the gill samples were taken and the analysis of the microanatomy structure was carried out descriptively. The result of the analysis showed that there were 0%-25% edema, 1%-75% lamella fusion, 0%-50% hyperplasia, 0%-50% epithelial lifting and 0%-50% necrosis. It was concluded that the value of  $LC_{50-96}$  hours in Nila Larasati fish toxicity test was 324.38 ppm; and microanatomy changes started to occur in the lead acetate concentration of 259.51 ppm.*

© 2014 Universitas Negeri Semarang

✉ Alamat korespondensi:

Gedung D6 Lantai 1, Kampus Unnes Sekaran,  
Gunungpati, Semarang, 50229  
E-mail: fatikhahmaharani@gmail.com

ISSN 0215-9945

## PENDAHULUAN

Secara umum diketahui bahwa logam berat merupakan elemen yang berbahaya di permukaan bumi. Masuknya logam berat ke lingkungan bisa berasal dari pertambangan minyak, emas, batu bara, pembangkit tenaga listrik, pestisida, keramik, peleburan logam, pabrik-pabrik pupuk, dan kegiatan industri lainnya, salah satu logam berat tersebut adalah timbal (Suhendrayatna 2001).

Berdasarkan Jalius (2008), timbal (Pb) merupakan polutan yang berbahaya dan sering terdeteksi di wilayah perairan hingga menuju ke laut. Penyebab utama timbal menjadi salah satu bahan pencemar berbahaya dikarenakan timbal tidak dapat dihancurkan (*non degradable*) oleh organisme hidup dan akan terakumulasi ke lingkungan, terutama mengendap di dasar perairan membentuk senyawa kompleks bersama bahan organik dan anorganik (Rochyatun & Rozak 2007). Timbal dalam konsentrasi tinggi dapat mengakibatkan kematian beberapa jenis biota perairan. Hutagalung (1997) menyatakan bahwa peningkatan kadar logam berat dalam air akan mengakibatkan logam berat yang semula dibutuhkan untuk berbagai proses metabolisme akan berubah menjadi racun bagi organisme. Peningkatan konsentrasi sebagian besar disebabkan oleh limbah buangan industri. Limbah industri inilah yang seringkali masuk ke sungai yang kemudian mengalir ke perairan laut. Umumnya jalur buangan dari bahan sisa industri yang menggunakan bahan tambahan timbal akan merusak lingkungan perairan yang dimasukinya.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Singhadach *et al.* (2009) tentang uji toksisitas timbal terhadap insang ikan Nila dihasilkan nilai  $LC_{50}$  sebesar 247,51 mg/l. Dari hasil uji tersebut memperlihatkan bahwa insang ikan mengalami beberapa kerusakan di antaranya edema, *epithelial lifting*, hiperplasia, fusi lamela, dan nekrosis. Kerusakan-kerusakan tersebut diakibatkan pengikatan lendir terhadap sejumlah timbal yang melewati lamela sehingga menghalangi proses pertukaran gas-gas dan ion pada lamela dalam sistem respirasi.

Timbal merupakan logam berat yang sangat beracun dan dapat dideteksi secara praktis pada seluruh benda mati di lingkungan dan seluruh

sistem biologis (Widaningrum *et al.* 2007). Keracunan timbal yang ditimbulkan oleh persenyawaan logam timbal dapat terjadi karena masuknya timbal ke dalam tubuh suatu organisme. Timbal juga bisa berdampak pada organisme perairan, yang masuk ke dalam tubuh organisme melalui rantai makanan, insang, atau difusi melalui permukaan kulit, sehingga apabila organisme tersebut dikonsumsi oleh manusia dapat berpengaruh dan membahayakan kesehatan manusia (Sorensen 1994).

Rand (1980) seperti yang diacu Yuniar (2009), menyebutkan bahwa salah satu jenis hewan yang direkomendasikan oleh EPA (*Environmental Protection Agency*) sebagai hewan uji adalah ikan *Oreochromis niloticus*. Di Indonesia ikan ini lebih dikenal dengan nama ikan Nila. Ikan Nila memenuhi persyaratan sebagai hewan uji karena mempunyai persebaran yang cukup luas, mempunyai nilai ekonomi yang cukup tinggi dan mudah dipelihara di laboratorium. Ikan Nila yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan Nila Larasati, merupakan salah satu jenis ikan Nila yang banyak diminati dan dibudidayakan di Jawa Tengah, khususnya di Balai Benih Induk (BBI) Janti, Klaten. Ikan Nila Larasati memiliki tingkat pertumbuhan yang cepat, memiliki daging banyak, toleransi terhadap perubahan lingkungan sangat tinggi, dan memiliki kematian yang lebih rendah (Zunita 2012).

Dari uraian di atas, maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui dampak yang ditimbulkan oleh logam berat timbal terhadap struktur mikroanatomi insang ikan Nila Larasati. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui nilai  $LC_{50-96}$  jam pada uji toksisitas ikan Nila Larasati yang dipapar timbal; mengetahui perubahan struktur mikroanatomi insang ikan Nila Larasati (*Oreochromis niloticus*) yang dipapar timbal; dan mengetahui konsentrasi timbal yang menyebabkan perubahan struktur mikroanatomi insang ikan Nila Larasati. Hipotesis dari penelitian ini adalah diperoleh konsentrasi  $LC_{50-96}$  jam untuk uji toksisitas pada ikan Nila Larasati yang dipapar timbal; terjadi perubahan struktur mikroanatomi insang ikan Nila Larasati (*Oreochromis niloticus* Var.) yang dipapar timbal; dan pada konsentrasi tertentu timbal menyebabkan perubahan struktur mikroanatomi insang ikan Nila Larasati.

**METODE PENELITIAN**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan acak lengkap (RAL). Prosedur penelitian melewati tiga tahap yaitu uji pendahuluan, uji toksisitas, dan uji perlakuan. Populasi dalam penelitian ini adalah ikan Nila Larasati (*Oreochromis niloticus*) yang didapat dari BBI Ikan Janti, Klaten. Sampel penelitian adalah ikan Nila Larasati dengan kriteria sehat; panjang tubuh antara 10-15 cm; umur sekitar ±2 bulan. Jumlah ikan yang digunakan pada uji pendahuluan sebanyak 60 ekor dilakukan selama dua hari, uji toksisitas 120 ekor dilakukan selama empat hari, dan uji perlakuan 80 ekor yang dibagi menjadi empat kelompok yaitu kontrol, diberi timbal konsentrasi LC<sub>50</sub>=324,38 ppm, LC<sub>50</sub>-10%=291,94 ppm, dan LC<sub>50</sub>-20%=259,51 ppm dilakukan selama empat minggu. Variabel dalam penelitian ini ada tiga yaitu variabel bebas, tergantung dan kendali. Variabel bebas dalam penelitian ini berupa perlakuan pemberian timbal dengan berbagai konsentrasi yaitu LC<sub>50</sub>, LC<sub>50</sub>-10%, dan LC<sub>50</sub>-20%. Variabel tergantung berupa

perubahan struktur mikroanatomi insang meliputi edema, hiperplasia, fusi lamela, *epithelial lifting*, dan nekrosis. Variabel kendali berupa berupa umur ikan, pakan ikan, ukuran ikan, dan kualitas air yang digunakan.

Perlakuan selama empat minggu dengan pengamatan tiap hari untuk menjaga aerasi dan pemberian pakan. Pada akhir minggu ke empat ikan diambil insangnya menggunakan alat bedah kemudian organ insang dimasukkan ke dalam botol vial yang sudah berisi formalin 10% untuk menjaga supaya tidak rusak. Selanjutnya organ insang dibuat jaringan mikroanatomi, kemudian dianalisis kerusakannya menggunakan mikroskop dengan perbesaran 40x10 dan hasilnya dilakukan dianalisis secara deskriptif.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Hasil pengamatan kerusakan struktur mikroanatomi insang ikan Nila Larasati yang dipapar timbal asetat selama empat minggu dalam berbagai konsentrasi disajikan dalam Tabel 1.

**Tabel 1.** Hasil pengamatan mikroanatomi insang ikan Nila Larasati setelah perlakuan 4 minggu dipapar timbal

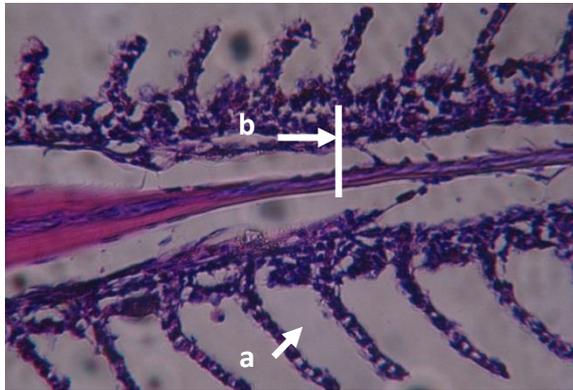
Konsentrasi (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Pb + 3H <sub>2</sub> O	Sampel	Struktur mikroanatomi insang				
		Edema	Fusi Lamela	Hiperplasia	<i>Ephitelial Lifting</i>	Nekrosis
Kontrol	K <sub>I</sub>	-	-	-	-	-
	K <sub>II</sub>	-	-	-	-	-
	K <sub>III</sub>	-	-	-	-	-
259,51 ppm	A <sub>I</sub>	+	++	+	+	+
	A <sub>II</sub>	+	++	-	+	-
	A <sub>III</sub>	+	+	++	-	+
291,94 ppm	B <sub>I</sub>	+	++	-	-	+
	B <sub>II</sub>	+	+	+	+	-
	B <sub>III</sub>	+	+	+	+	-
324,38 ppm	C <sub>I</sub>	+	++	-	+	-
	C <sub>II</sub>	-	++	-	+	+
	C <sub>III</sub>	+	+++	-	+	-

- Keterangan : (-) = tidak terjadi perubahan mikroanatomi (0%)  
 (+) = terjadi sedikit perubahan struktur mikroanatomi (1%-25%)  
 (++) = terjadi sedang perubahan struktur mikroanatomi (26%-50%)  
 (+++) = terjadi banyak perubahan struktur mikroanatomi (51%-75%)  
 (++++) = terjadi sangat banyak perubahan struktur mikroanatomi (76%-100%)

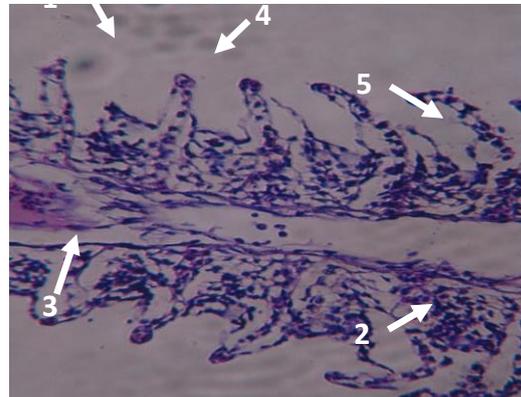
Hasil pengamatan kerusakan struktur mikroanatomi insang ikan Nila Larasati dalam berbagai konsentrasi timbal berupa edema (0%-25%), fusi lamela (1%-75%), hiperplasia(0%-

50%), *epithelial lifting* (0%-50%), dan nekrosis (0%-50%).

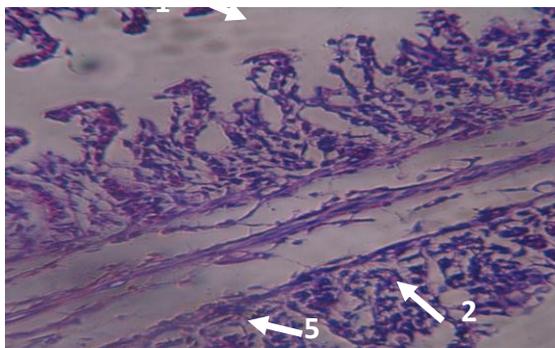
Untuk mengetahui gambaran perubahan struktur mikroanatomi insang ikan Nila Larasati yang dipapar timbal dapat dilihat pada Gambar 1-4.



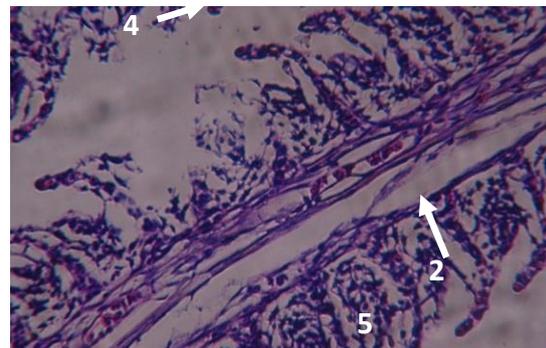
**Gambar 1.** Potongan melintang struktur mikroanatomi insang ikan Nila Larasati pada kondisi normal (perbesaran 10x40). Keterangan: a. Lamela sekunder, b. Lamela primer



**Gambar 2.** Potongan melintang struktur mikroanatomi insang ikan Nila Larasati pada konsentrasi timbal 259,51 ppm (A<sub>I</sub>) (perbesaran 10x40)



**Gambar 3.** Potongan melintang struktur mikroanatomi insang ikan Nila Larasati pada konsentrasi timbal 291,94 ppm (B<sub>I</sub>) (perbesaran 10x40)



**Gambar 4.** Potongan melintang struktur mikroanatomi insang ikan Nila Larasati pada konsentrasi timbal 324,38 ppm (C<sub>II</sub>) (perbesaran 10x40)

- Keterangan gambar:
1. Edema
  2. Fusi lamela
  3. Hiperplasia
  4. *Epithelial lifting*
  5. Nekrosis

### Pembahasan

Nilai LC<sub>50</sub> merupakan konsentrasi median lethal timbal asetat yang menyebabkan mortalitas (kematian) 50% hewan uji. Uji toksisitas dilakukan selama 96 jam untuk mengetahui tingkat racun

suatu zat toksik (Yulianto 2012). Perhitungan analisa probit diperoleh Nilai LC<sub>50</sub>-96 jam sebesar 324,38 ppm. Hasil tersebut tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Singhadach *et al.* (2009) terhadap

ikan Nila dengan nilai  $LC_{50}$  sebesar 247,51 ppm. Hasil uji toksisitas ikan Nila Larasati sedikit lebih besar dibandingkan dengan hasil uji toksisitas dari penelitian sebelumnya sehingga dapat dikatakan bahwa ikan Nila Larasati memiliki ketahanan yang cukup tinggi terhadap perubahan lingkungan dan memiliki tingkat kematian yang rendah (Zunita 2012).

Proses masuknya timbal ke dalam insang menurut Palar (1994) adalah timbal bersama-sama dengan ion-ion logam lain akan membentuk ion-ion yang dapat larut dalam lemak. Ion-ion logam yang dapat larut dalam lemak itu mampu untuk melakukan penetrasi pada membran sel insang sehingga akhirnya ion-ion logam tersebut akan dapat masuk ke dalam insang.

Hasil pengamatan perubahan jaringan insang pada ikan Nila larasati yang dipapar oleh timbal asetat pada uji perlakuan selama empat minggu menunjukkan hasil kerusakan edema 0%-25%, fusi lamela antara 1%-75%, hiperplasia 0%-50%, *epithelial lifting* 0%-50%, dan nekrosis 0%-50%. Berdasarkan hasil ini dapat disimpulkan bahwa pemberian timbal asetat menyebabkan kerusakan sedang pada sel insang ditandai dengan adanya kerusakan paling besar yaitu fusi lamela disusul dengan kerusakan lainnya yaitu edema, hiperplasia, *epithelial lifting*, dan nekrosis.

Pada kerusakan edema dari ketiga perlakuan tidak ada bedanya karena hampir semua <25% dan terjadi hampir merata pada semua sampel ikan. Dalam penelitian ini terjadinya edema disebabkan masuknya timbal asetat ke dalam insang yang mengakibatkan sel bersifat iritatif sehingga sel akan membengkak (Rennika *et al.* 2013).

Edema adalah pembengkakan sel yang diakibatkan masuknya timbal asetat ke dalam insang atau penimbunan cairan secara berlebihan di dalam jaringan tubuh yang di tandai dengan membran basal mulai meregang lepas, sel lacuna menyempit sehingga menyebabkan insang mengalami defisiensi fungsi dan kesulitan dalam proses pernafasan dan metabolisme tubuh mulai terganggu (Fitriawan *et al.* 2011).

Kerusakan lain yang terjadi adalah hiperplasia, pada penelitian ini hiperplasia hanya terjadi pada kelompok 259,51 ppm dan 291,94 ppm dengan kerusakan rata-rata <50%. Hiperplasia terjadi pada tingkat iritasi yang lebih

rendah dan biasanya disertai peningkatan jumlah sel-sel mukus di dasar lamela dan mengakibatkan fusi lamela. Ruang interlamela yang merupakan saluran air dan ruang produksi mukus dapat tersumbat akibat hiperplasia sel epitel yang berasal dari filamen primer. Pada akhirnya seluruh ruang interlamela diisi oleh sel-sel baru. Hiperplasia mengakibatkan penebalan jaringan epitel di ujung filamen yang memperlihatkan bentuk seperti pemukul bisbol (*clubbing distal*) atau penebalan jaringan epithelium yang terletak di dekat dasar lamela (Robert 2001). Pada penelitian ini, perlakuan 324,38 ppm tidak menyebabkan kerusakan hiperplasia karena sudah menjadi fusi lamela.

Pada kerusakan fusi lamela dijumpai pada ketiga perlakuan dan untuk perlakuan 324,38 ppm nilai persentasenya paling besar. Terjadinya fusi lamela diakibatkan dari sel mukus yang berada di dasar lamela meningkat jumlahnya sehingga terjadi penggabungan antar lamela sekunder.

Robert (2001) mengatakan fusi lamela merupakan penempelan dua bagian lamela sekunder. Selain itu fusi lamela juga diakibatkan oleh adanya lendir yang berlebih pada insang sehingga akan menutup lamela sekunder. Lendir berlebih ini merupakan salah satu respon dari kelenjar mukus untuk melindungi insang dari timbal yang masuk dalam bentuk ion ke dalam insang.

*Epithelium lifting* hampir semua ditemukan terutama pada perlakuan 324,38 ppm walaupun dengan persentase yang rendah. *Epithelial lifting* adalah pembengkakan ringan sel insang akibat masuknya ion timbal sehingga mengakibatkan terangkatnya epitel pipih lamela sekunder yang menyelubungi lamela sekunder yang berfungsi sebagai mekanisme pertahanan. Terangkatnya epitel pipih lamela sekunder ini merupakan bentuk pertahanan untuk meningkatkan jarak polutan dalam bentuk ion timbal yang terkandung dalam air sehingga air harus berdifusi untuk mencapai aliran darah (Antonio *et al.* 2007).

Kerusakan nekrosis ditemukan secara acak pada ketiga perlakuan dengan persentase yang rendah yaitu <25%. Nekrosis terjadi karena hiperplasi dan fusi lamela sekunder yang berlebihan, sehingga jaringan insang tidak berbentuk utuh lagi. Hal ini disebabkan oleh

konsentrasi timbal di air terlalu tinggi dan terjadi penyerapan ion-ion timbal secara terus-menerus ke dalam jaringan insang. Pada kejadian ini lamela mengalami kerusakan parah dan termasuk dalam kategori pencemaran berat (Rennika *et al.* 2013).

Penyerapan timbal yang secara terus menerus melalui insang sangat memberikan dampak kerusakan pada jaringan insang ikan, sehingga dapat menimbulkan kematian terhadap ikan yang disebabkan oleh proses *anoxemia*, yaitu terhambatnya fungsi pernafasan dari insang. Kerusakan insang yang terkena logam berat mengakibatkan adanya degradasi sel atau bahkan kerusakan jaringan insang. Menurut Sandi (1994), bahan anorganik dapat secara langsung terlarut menyebabkan iritasi pada insang dan tertutupnya lamela insang. Hal ini menyebabkan fungsi insang menjadi tidak wajar dan mengganggu proses pernafasan.

Kerusakan pada struktur mikroanatomi insang menyebabkan ikan sulit bernafas dan menyebabkan kandungan oksigen dalam darah menjadi berkurang sehingga Hb kesulitan dalam mengikat oksigen dan mengalami hipoksi sebagai akibat dari kerusakan lamella sekunder dari insang (Ishikawa *et al.* 2007).

## PENUTUP

Nilai  $LC_{50-96}$  jam pada uji toksisitas ikan Nila Larasati (*Oreochromis niloticus*) yang dipapar timbal yaitu 324,38 ppm dan mulai terjadi perubahan struktur mikroanatomi insang ikan pada konsentrasi 259,51 ppm. Perubahan kerusakan yang terjadi berupa edema, fusi lamela, hiperplasia, *epithelial lifting*, dan nekrosis.

## DAFTAR PUSTAKA

- Antonio FF, Jorge V, Ferreira C, Sofia GS, Sandra MM, Joao C, Pedro M, Antonio FF. 2007. Histopathological changes in liver and gill epithelium of nila tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to waterborne copper. *Pesq Vet Bras* 27(3): 25-30.
- Fitriawan F, Sutarno, & Sunarto. 2011. Perubahan mikroanatomi pada insang dan ginjal kerang air tawar (*Anodonta woodiana*) terhadap paparan kadmium. *Bioteknologi* 8(1): 42-52.
- Hutagalung HP. 1997. *Metode Analisis Air Laut, Sedimen dan Biota*. Jakarta: Pusat Penelitian dan Pengembangan Oseanologi.
- Ishikawa NM, Maria JT, Julio VL, & Claudia MF. 2007. Hematological parameters in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* exposed to sub-lethal concentration of mercury. *Braz Arch Biol Technol*. 50(4): 13-16.
- Jalius. 2008. Bioakumulasi Logam Berat dan Pengaruhnya terhadap Gametogenesis Kerang Hijau (*Perna viridis*): Studi Kasus di Teluk Jakarta, Teluk Banten dan Teluk Lada (*Disertasi*). Bogor: Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Palar H. 1994. *Pencemaran dan Toksikologi Logam Berat*. Jakarta: Rineka Cipta.
- Rennika, Aunurohim, & Nurlita, A. 2013. Konsentrasi dan lama pemaparan senyawa organik dan anorganik pada jaringan insang ikan mujair (*Oreochromis mossambicus*) pada kondisi sub lethal. *Jurnal Sains dan Seni Pomits* 2(2): 132-137.
- Robert RJ. 2001. *Fish Pathology*. USA: W. B. Saunders.
- Rochyatun E & Rozak A. 2007. Pemantauan kadar logam berat dalam sedimen perairan Teluk Jakarta. *Makara Sains* 11(1): 28-36.
- Sandi E. 1994. Pengaruh Padatan Tersuspensi terhadap Tingkat Kematian dan Pertumbuhan Nener Bandeng (*Chanos chanos Forskal*) pada Media Uji (*Skripsi*). Semarang: Universitas Diponegoro.
- Singhadach P, Jiraungkoorskul W, Tansatit T, Kosai P, & Ariyasrijit C. 2009. Calcium pre-exposure histopathological alteration in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after lead exposure. *J Fish Aqu*. 1: 1-10.
- Sorensen EMB. 1994. *Metal Poisoning in Fish*. CRC Press Boca Ann Arbor, Boston.
- Suhendrayatna. 2001. *Biorevormal Logam Berat dengan Menggunakan Mikroorganisme suatu Kajian Kepustakaaan Institute For Science and Technology Studies (ISTECS)*. Japan: Capter.
- Widaningrum, Miskiyah, & Suismono, 2007. Bahaya kontaminasi logam berat dalam sayuran dan alternatif pencegahan cemarannya. *Buletin Teknologi Pascapanen Pertanian* 3: 17-27.
- Yulianto B. 2012. *Uji Toksisitas Akut*. Semarang: Jurusan Ilmu Kelautan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Diponegoro.
- Yuniar V. 2009. Toksisitas Merkuri (Hg) terhadap Tingkat Kelangsungan Hidup, Pertumbuhan, Gambaran Darah dan Kerusakan Organ pada Ikan Nila *Oreochromis niloticus* (*Skripsi*). Bogor: Jurusan Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.
- Zunita IN. 2012. Pengaruh Substitusi Tepung Ikan dengan Silase Isi Rumen Sapi dalam Pakan Buatan terhadap Pertumbuhan Benih Ikan Nila Larasati (*Oreochromis niloticus* Var.) (*Skripsi*). Semarang: Universitas Diponegoro Semarang.