

Perubahan Histopatologi Ginjal Mencit (*Mus musculus*)

Akibat Pembatasan Pemberian Air Minum

(*KIDNEY HISTOPATHOLOGY CHANGES OF MICE
(Mus musculus) DUE TO DRINKING WATER RESTRICTION*)

Firnanda Septianira¹,
I Ketut Berata², Ni Nyoman Werdi Susari³

¹Mahasiswa Sarjana Pendidikan Dokter Hewan, ²Laboratorium Patologi Veteriner,
³Laboratorium Anatomi dan Embriologi Veteriner,
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana,
Jl. Sudirman, Sanglah, Denpasar, Bali, Indonesia, 80234,
Telp/Fax: (0361) 255128
Email: firmandaseptianira@gmail.com

ABSTRAK

Organ ginjal berperan penting dalam mengatur keseimbangan cairan tubuh. Pembatasan air minum jangka panjang dapat menyebabkan dehidrasi sehingga meningkatkan risiko terjadinya batu ginjal dan infeksi saluran kemih. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis gambaran histopatologi ginjal mencit akibat pembatasan pemberian air minum. Penelitian ini menggunakan 24 ekor mencit yang dibagi atas empat perlakuan terdiri dari P0 (diberikan air minum 5 mL/hari), P1 (diberikan air minum 3,75 mL/hari), P2 (diberikan air minum 2,5 mL/hari), dan P3 (diberikan air minum 1,25 mL/hari) selama 30 hari. Pada hari ke-31 semua mencit dinekropsi dengan dislokasi leher kemudian dilakukan pengambilan organ ginjal dan selanjutnya dibuat preparat histopatologi dengan metode pewarnaan hematoksilin eosin (HE). Perubahan histopatologi diamati dan diskoring berdasarkan lesi tahapan nekrosis pada sel tubulus ginjal yaitu piknosis, karyorrheksis, dan karyolisis. Perubahan histopatologi lainnya diuraikan secara deskriptif. Hasil penelitian diperoleh rerata tingkat kerusakan sel tubulus tertinggi pada P3 dengan skor 2 yaitu antara 25-50%, lebih besar dibandingkan P1 dengan rata-rata skor 1 yaitu <25% dan P2 dengan rata-rata skor 1,2 yaitu <25%. Pada P3 menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan perlakuan-perlakuan lainnya sehingga dapat disimpulkan bahwa pembatasan pemberian air minum selama 30 hari dengan pembatasan air minum sebesar 75% dari volume normal yaitu 1,25 mL/hari menyebabkan terjadinya perubahan histopatologi ginjal mencit meliputi lesi nekrosis, penyempitan kapsula Bowman, adanya endapan protein pada lumen tubulus dan terjadi peningkatan kerusakan sel tubulus pada organ ginjal.

Kata-kata kunci: dehidrasi; ginjal; histopatologi; mencit; pembatasan air minum

ABSTRACT

The kidneys play an important role in regulating the balance of body fluids. Long-term restriction of drinking water causes dehydration, increasing the risk of developing kidney stone and urinary tract infections. This study aims to analyze the histopathological features of the kidney of mice due to drinking water restrictions. This study used 24 mice which were divided into four treatments consisting of the control group P0 (given drinking water 5 mL/day), P1 (given drinking water 3.75 mL/day), P2 (given drinking water 2.5 mL/day) and P3 (given 1.25 mL/day) for 30 days. On day 31 all mice were necropsied for kidney organ collection. Furthermore, histopathological preparations were made using the hematoxylin eosin (HE) staining method. Histopathological changes were observed and scored based on the stages of necrosis in renal tubular cells, i.e., pyknosis, karyorrhexis and karyolysis. Other histopathological changes were described descriptively. The results showed that the highest average level of tubular cell damage was in the P3 group with a score of 2, which was between 25-50%, greater than the P1 group with an average score of 1, which was <25% and the P2 group with

an average score of 1.2 i.e. <25%. The P3 group showed a significant difference between other treatments, so it can be concluded that the limitation of drinking water for 30 days with the restriction of drinking water by 75% of the normal amount of 1.25 mL/day caused histopathological changes in the kidneys of mice in the form of necrotizing lesions, narrowing of the kidney. Bowman's capsule, the presence of protein deposits in the tubular lumen and an increase in tubular cell damage in the kidney organs.

Keywords: dehydration; kidney; histopathology; mice; drinking water restriction

PENDAHULUAN

Kebutuhan akan asupan gizi hewan peliharaan hendaknya menjadi kebutuhan yang harus diperhatikan oleh pemilik hewan. Kebutuhan gizi dapat berupa karbohidrat, protein, lemak, vitamin, mineral, dan air harus tercukupi dalam menjaga kesehatan hewan peliharaan. Air merupakan komponen utama dari semua struktur sel, sebagai salah satu zat gizi makro yang mempunyai peran penting bagi tubuh, seperti metabolisme, pengangkutan dan sirkulasi zat gizi dan non gizi, pengendalian suhu tubuh, kontraksi otot, transmisi impuls saraf, pengaturan keseimbangan elektrolit, dan proses pembuangan zat yang tidak berguna bagi tubuh. Metabolisme tubuh akan berjalan dengan baik apabila pemenuhan kebutuhan air untuk menggantikan air tubuh yang hilang dapat terpenuhi setiap harinya. Konsumsi air minum yang tidak cukup menyebabkan adanya gangguan keseimbangan cairan tubuh.

Dehidrasi adalah suatu keadaan dimana keseimbangan cairan tubuh terganggu karena hilangnya cairan tubuh baik cairan intraselular maupun cairan ekstraselular tanpa diimbangi dengan konsumsi cairan yang cukup. Kebutuhan air dalam tubuh yang tidak terpenuhi disebabkan oleh jumlah cairan yang keluar (*outtake*) lebih banyak daripada jumlah cairan yang masuk (*intake*) ke dalam tubuh sehingga menyebabkan kekurangan cairan. Secara normal, tubuh akan kehilangan cairan setiap harinya, hilangnya cairan dapat terjadi melalui keringat, urin, air mata, dan feses. Contoh penyebab dehidrasi yaitu dalam kasus aktivitas yang berlebihan, kurang mengkonsumsi cairan, muntah, dan diare. Menurut Popkin *et al.* (2010), organ ginjal memainkan peran penting dalam mengatur keseimbangan cairan. Ginjal adalah organ ekskresi pada hewan vertebrata, berbentuk seperti kacang yang memiliki fungsi utama yaitu menyaring kotoran (terutama urea) dari darah dan membuang bersama dengan air dalam bentuk urin. Ginjal akan menghasilkan urin yang lebih pekat jika kekurangan air, sehingga ginjal akan membutuhkan energi yang lebih besar dan lebih banyak kerusakan pada jaringannya. Penelitian yang dilakukan Roncal-Jimenez *et al.* (2015) pada hewan coba yang berulang kali terkena panas dan pembatasan pemberian air dapat menunjukkan pengembangan penyakit ginjal kronis. Oleh sebab itu, penting untuk memperhatikan asupan air minum hewan

peliharaan dalam jumlah yang cukup untuk membantu dan melindungi organ ginjal.

Terdapat banyak penelitian mengenai efek dehidrasi terhadap organ ginjal, salah satunya penelitian yang dilakukan Roncal-Jimenez *et al.* (2015) pada hewan coba yang berulang kali terkena panas dan pembatasan pemberian air dapat menunjukkan pengembangan penyakit ginjal kronis. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui perubahan histopatologi organ ginjal akibat pembatasan pemberian air minum dalam jangka waktu yang telah ditentukan selama 30 hari sehingga hasil penelitian ini dapat menjadi bahan pertimbangan untuk meningkatkan pengetahuan masyarakat terutama pemilik hewan peliharaan akan pentingnya dalam mencukupi kebutuhan cairan tubuh dan meminimalisir adanya gangguan keseimbangan cairan tubuh dari hewan peliharaan tersebut.

METODE PENELITIAN

Penelitian telah disetujui oleh Komisi Etik Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana dengan nomor: B/85/UN14.2.9/PT.01.04/2021. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental rancangan acak lengkap (RAL) dengan empat perlakuan masing-masing terdiri dari enam ulangan. Sebanyak 24 ekor mencit jantan (*Mus musculus*) galur *Swiss Webster*, berumur 2-3 bulan dengan bobot antara 25-35 g diadaptasikan selama satu minggu sebelum perlakuan di Laboratorium Patologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana. Pemeriksaan fisik dilakukan untuk memastikan mencit dalam keadaan sehat berupa detak jantung, laju pernapasan, warna membran mukosa dan CRT (*Capillary Refill Time*). Semua mencit dipelihara dalam kondisi yang sama, diberi pakan berupa konsentrat dan diberi minum secara *ad libitum*. Mencit dibagi dalam empat perlakuan dengan ulangan masing-masing enam kali. Penentuan tiap perlakuan sampel dilakukan secara acak sederhana (*simple random sampling*).

Perlakuan yang diberikan pada penelitian ini terdiri atas perlakuan kontrol (P0) diberikan air minum 5 mL/hari, perlakuan 1 (P1) diberikan air minum 3,75 mL/hari, perlakuan 2 (P2) diberikan air minum 2,5 mL/hari dan perlakuan 3 (P3) diberikan air minum 1,25 mL/hari selama 30 hari. Mencit dieutanasi dengan melakukan dislokasi leher pada hari ke-31. Teknik pembedahan insisi paracostal dilakukan untuk mengambil sampel organ ginjal. Setelah itu organ ginjal dibersihkan menggunakan larutan NaCl 0,9% dan disimpan dalam larutan formalin 10%. Sampel dibawa ke Balai Besar Veteriner (BBVet) Denpasar untuk dilakukan pembuatan preparat histopatologi dengan proses untuk pewarnaan hematoksilin eosin (HE). Pengamatan histopatologi menggunakan mikroskop cahaya dilakukan di Laboratorium

Patologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana. Metode pengamatan preparat histopatologi ginjal yaitu dengan menghitung persentase sel tubulus ginjal yang abnormal pada setiap preparat masing-masing lima lapang pandang mikroskopik. Skoring derajat histopatologi ginjal dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Skoring histopatologi pada organ ginjal (Wibowo *et al.*, 2012).

Skor	Kriteria Kerusakan
0	Tidak ada lesi dari total lapang pandang
1	Lesi <25% dari total lapang pandang.
2	Lesi 25 - 50% dari total lapang pandang.
3	Lesi 50 - 75% dari total lapang pandang.
4	Lesi \geq 75% dari total lapang pandang.

Keterangan: lesi berupa tahapan nekrosis yaitu piknosis, karyorrheksis, dan karyolisis.

Proses analisis data menggunakan perangkat lunak *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS). Data skoring yang diperoleh di analisis dengan uji statistika non parametrik Kruskal Wallis, dan perbedaan antar perlakuan yang nyata ($P < 0,05$) dilanjutkan dengan uji Mann Whitney. Perubahan histopatologi lainnya yang ditemukan pada organ ginjal mencit diuraikan secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil perubahan histopatologi organ ginjal mencit tersaji pada Tabel 2. Hasil pengamatan gambaran histopatologi ginjal berupa jumlah sel tubulus ginjal yang mengalami kerusakan akibat pembatasan pemberian air minum. Rerata tertinggi skor perubahan histopatologi ginjal mencit adalah pada perlakuan 3 (P3) yaitu $2,00 \pm 0,000$ dengan tingkat kerusakan tubulus ginjal sebesar 25-50% dan rerata terendah skor perubahan histopatologi ginjal mencit adalah pada perlakuan kontrol (P0) dan perlakuan 1 (P1) yaitu $1,00 \pm 0,000$ dengan tingkat kerusakan tubulus ginjal sebesar <25%.

Tabel 2. Hasil perubahan histopatologi ginjal mencit (*Mus musculus*) akibat pembatasan pemberian air minum

Variabel	Rerata \pm SD	Signifikansi
P0	$1,00 \pm 0,000$	A
P1	$1,00 \pm 0,000$	A
P2	$1,20 \pm 0,447$	A
P3	$2,00 \pm 0,000$	B

Keterangan: P0 = Pemberian air minum normal (5 mL/hari)

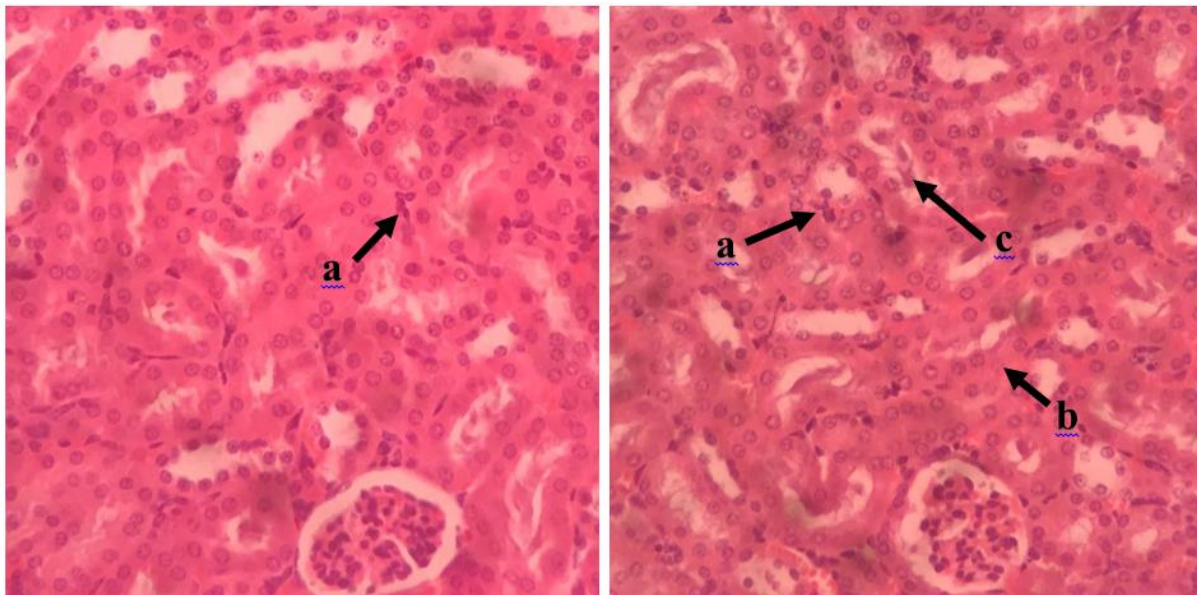
P1 = Pembatasan air minum 25% dari jumlah normal (3,75 mL/hari)

P2 = Pembatasan air minum 50% dari jumlah normal (2,5 mL/hari)

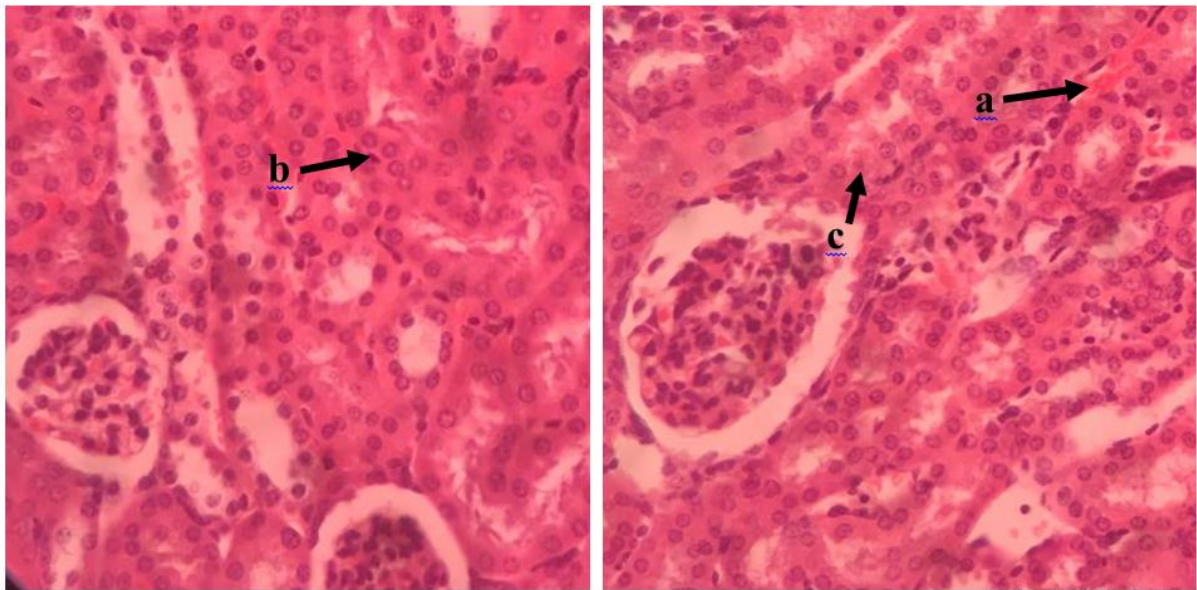
P3 = Pembatasan air minum 75% dari jumlah normal (1,25 mL/hari)

*huruf yang sama dalam kolom signifikansi menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata ($P > 0,05$)

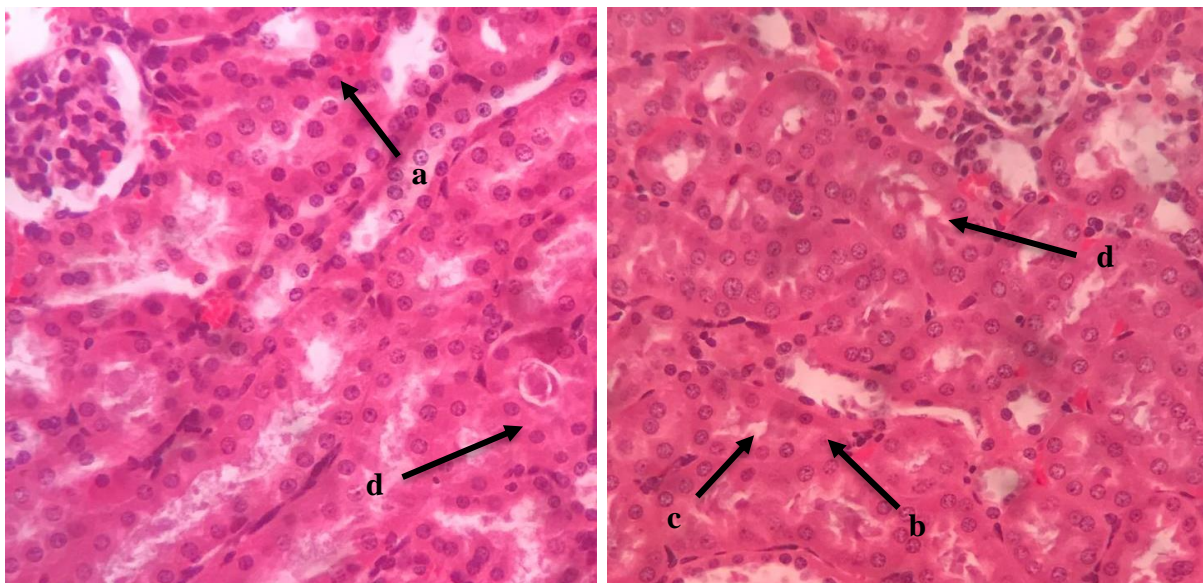
Hasil analisis terhadap data skoring perubahan histopatologi didapatkan sebaran data tidak normal, maka dilakukan uji Kruskal-Wallis. Hasil uji Kruskal-Wallis didapatkan $P=0,002$ ($P<0,05$), artinya terdapat perbedaan yang nyata antar perlakuan. Dilakukan uji lanjut Mann Whitney untuk mengetahui letak perbedaan signifikan antar perlakuan tersebut. Hasil uji Mann Whitney antara perlakuan 3 (P3) dengan seluruh perlakuan didapatkan hasil $P<0,050$ artinya terdapat perbedaan yang nyata antar perlakuan. Dapat disimpulkan pada perlakuan 3 (P3) dengan pembatasan air minum 75% dari jumlah normal yaitu 1,25 mL/hari selama 30 hari dapat menyebabkan adanya perubahan histopatologi ginjal mencit dan terjadi peningkatan kerusakan sel tubulus pada organ ginjal jika dibandingkan perlakuan 1 (P1) dan perlakuan 2 (P2) dengan pembatasan air minum 25% dan 50% dari jumlah normal. Hal ini sejalan dengan pernyataan Popkin *et al.* (2010), jika ginjal kekurangan air, akan menghasilkan urin yang lebih pekat, sehingga ginjal akan membutuhkan energi yang lebih besar dan lebih banyak mengalami kerusakan pada jaringannya. Gambaran histopatologi ginjal mencit (*Mus musculus*) akibat pembatasan air minum selama 30 hari pada masing-masing perlakuan diuraikan sebagai berikut.



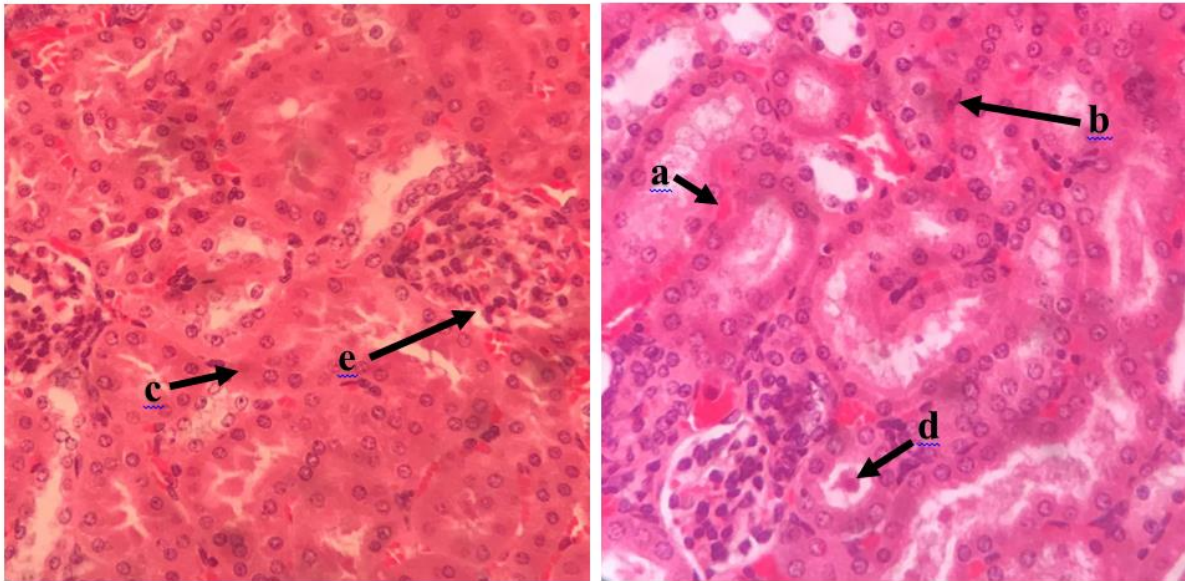
Gambar 1. Gambaran histopatologi ginjal mencit pada perlakuan kontrol (P0) terlihat adanya (a) karyorrheksis, (b) karyolisis pada tubulus proksimal, dan (c) endapan protein pada lumen tubulus (HE, 400 kali).



Gambar 2. Gambaran histopatologi ginjal mencit pada perlakuan 1 (P1) terlihat adanya (a) hemoragi, (b) karyorrheksis, (c) karyolisis pada tubulus proksimal, (d) endapan protein pada lumen tubulus, dan (e) penyempitan kapsula Bowman (HE, 400 kali).



Gambar 3. Gambaran histopatologi ginjal mencit pada perlakuan 2 (P2) terlihat adanya (a) hemoragi, (b) karyorrheksis, (c) karyolisis pada tubulus proksimal dan (d) endapan protein pada lumen tubulus (HE, 400 kali).



Gambar 4. Gambaran histopatologi ginjal mencit pada perlakuan 3 (P3) terlihat adanya (a) hemoragi, (b) karyorrheksis dan (c) karyolisis pada tubulus proksimal (HE, 400 kali).

Pada perlakuan kontrol (P0) tetap memperlihatkan adanya kerusakan meskipun diberikan air minum dalam jumlah normal. Hal ini bisa terjadi akibat hewan coba yang digunakan tidak bersifat *specific pathogen free* (SPF), sehingga bisa saja sebelum hewan coba digunakan sudah mengalami gangguan patologis yang tidak diharapkan pada organ ginjal akibat faktor diluar perlakuan (Berata *et al.*, 2011). Menurut Cotran *et al.* (2007) hal tersebut juga dapat terjadi karena adanya proses fisiologis apoptosis yang dialami sel normal. Secara alami sel dalam tubuh akan mengalami penuaan dan kematian sel, yang kemudian dalam proses regenerasi akan digantikan sel-sel yang baru.

Perubahan berupa hemoragi terlihat pada gambaran histopatologi seluruh perlakuan. Hemoragi atau pendarahan merupakan kondisi yang ditandai dengan darah yang keluar dari pembuluh darah akibat kerusakan dindingnya yang secara patologis ditandai adanya sel darah merah di luar pembuluh darah atau dalam jaringan. Penyebab terjadinya hemoragi bermacam-macam, yaitu adanya trauma, agen infeksius, defisiensi vitamin C, dan adanya paparan zat toksik.

Pada gambaran histopatologi perlakuan 3 (P3) terlihat mengalami penyempitan kapsula Bowman dan terdapat endapan protein pada lumen tubulus ginjal. Perlakuan 3 (P3) yang diberikan pembatasan air minum sebesar 75% dari jumlah normal selama 30 hari sehingga timbul kondisi dehidrasi berulang yang dapat merangsang sistem renin angiotensin aldosteron (RAAS). Menurut Jumaydha *et al.* (2016) bahwa terdapat pengaruh aktivasi sistem renin

angiotensin aldosteron (RAAS) terhadap penurunan hemodinamik ginjal yang berakibat pada peningkatan permeabilitas membran glomerulus dan laju filtrasi glomerulus (LFG) sehingga terjadi pembengkakan serta edema di glomerulus yang mengakibatkan ruang Bowman pada ginjal menyempit. Adanya peningkatan permeabilitas kapiler juga menyebabkan molekul protein yang berukuran besar dapat lolos keluar memasuki filtrat (Mayori *et al.*, 2013).

Pembatasan pemberian air minum selama 30 hari dapat menyebabkan perubahan histopatologi ginjal menciit. Hal ini didukung oleh penelitian Bongers *et al.* (2018) yang menyebutkan bahwa dehidrasi dapat merangsang sekresi arginine vasopressin (AVP) dan sistem renin angiotensin aldosteron (RAAS), kemudian merangsang reabsorpsi air dan natrium oleh organ ginjal. Peningkatan penyerapan natrium ginjal yang membutuhkan energi lebih dan penurunan perfusi ginjal dapat menyebabkan cedera pada organ ginjal. Pembatasan air minum menyebabkan tubuh menciit melakukan adaptasi untuk mempertahankan metabolisme agar tetap berjalan secara normal. Menurut Habibah *et al.* (2018), tubuh hewan mengalami stress fisiologis apabila melakukan adaptasi untuk mencapai kondisi baru demi mempertahankan metabolisme yang normal. Szende dan Suba (2000) menambahkan bahwa sejumlah besar adaptasi diikuti dengan adanya perubahan struktural yang terlihat secara mikro, namun perubahan tersebut merupakan pola pertumbuhan yang normal pada jaringan. Ketidakmampuan untuk beradaptasi terhadap perubahan lingkungan menyebabkan terjadinya kerusakan struktural pada sel.

Kerusakan struktural pada sel ginjal yang terjadi disebabkan karena adanya kondisi dehidrasi oleh pembatasan pemberian air minum. Dehidrasi menyebabkan aktifnya jalur reduktase aldosa di korteks ginjal, yang dalam prosesnya menghasilkan fruktosa. Selanjutnya fruktosa dimetabolisme menjadi fruktosa-1-fosfat, tetapi selama prosesnya terdapat konsumsi ATP intraseluler, yang menyebabkan penipisan fosfat intraseluler, aktivasi AMP deaminase, pembentukan asam urat, stress oksidatif, dan produksi kemokin. Adanya stress oksidatif ini yang kemudian berinteraksi dengan komponen membran sehingga dapat mengganggu permeabilitas, integrasi membran sel, dan terjadi kerusakan (Roncal-Jimenez *et al.*, 2015). Menurut Simanjutak (2007), terganggunya permeabilitas membran menyebabkan aliran zat-zat yang keluar masuk dalam sel menjadi tidak terkontrol, sedangkan gangguan terhadap integritas membran menyebabkan perubahan struktur sehingga sel menjadi mudah lisis. Selain itu, hormon arginine vasopressin (AVP), efektor *renin angiotensin system* (RAS), dan angiotensin II yang diproduksi selama dehidrasi memiliki peran yang penting. Hormon tersebut dapat menimbulkan efek signifikan pada tekanan arteri, hemodinamik glomerulus, dan

mekanisme ginjal non hemodinamik yang dapat menyebabkan adanya perubahan fungsi dan morfologi ginjal dalam mengatur dehidrasi berulang (Hilliard *et al.*, 2016).

SIMPULAN

Pembatasan pemberian air minum hingga 75% dari volume kebutuhan air normal (1,25 mL/hari) selama 30 hari dapat menyebabkan perubahan histopatologi pada sel tubulus organ ginjal mencit berupa tahapan nekrosis meliputi piknosis, karyorrheksis dan karyolisis, terjadi penyempitan kapsula Bowman, terdapat endapan protein pada lumen tubulus, dan terjadi peningkatan kerusakan sel tubulus pada organ ginjal.

SARAN

Asupan air minum pada hewan peliharaan perlu diperhatikan oleh pemilik hewan dan disediakan secara *ad libitum* sehingga kebutuhan cairan tubuh dapat terpenuhi dan dapat meminimalisir adanya gangguan keseimbangan cairan tubuh dari hewan peliharaan tersebut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala Balai Besar Veteriner (BBVet) Denpasar dan Kepala Laboratorium Anatomi dan Patologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana atas fasilitas yang telah diberikan untuk mendukung dilaksanakannya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Berata IK, Winaya IBO, Adi AAAM, Adnyana IBW. 2011. *Patologi Veteriner Umum*. Denpasar. Swasta Nulus. Hlm. 106-198.
- Bongers CCWG, Alsady M, Nijenhuis T, Tulp ADM, Eijsvogels TMH, Deen PMT, Hopman MTE. 2018. Impact of Acute *versus* Prolonged Exercise and Dehydration on Kidney Function and Injury. *Physiological Reports* 6(11): 1-11.
- Cotran RS, Rennke H, Kumar V. 2007. *Buku Ajar Patologi*. 7th Edition. Jakarta. EGC. Hlm. 795-800.
- Habibah N, Dhyhanaputri IGAS, Karta IW, Dewi NNA. 2018. Analisis Kuantitatif Kadar Nitrit dalam Produk Daging Olahan di Wilayah Denpasar Dengan Metode Griess Secara Spektrofotometri. *Journal of Natural Sciences and Engineering* 2(1): 1-9.
- Hilliard LM, Colafella KM, Bulmer LL, Puelles VG, Singh RR, Ow CP, Gaspari T, Drummond GR, Evans RG, Vinh A, Denton KM. 2016. Chronic Recurrent Dehydration Associated with Periodic Water Intake Exacerbates Hypertension and Promotes Renal Damage in Male Spontaneously Hypertensive Rats. *Scientific Report* 6(1): 1-13.
- Jumaydha LN, Assa YA, Mewo YM. 2016. Gambaran Kadar Protein dalam Urin pada Pekerja Bangunan. *Jurnal e-Biomedik* 4(2): 1-5.
- Mayori R, Marusin N, Tjong DH. 2013. Pengaruh Pemberian Rhodamin B terhadap Struktur

- Histologis Ginjal Mencit Putih (*Mus musculus* L.). *Jurnal Biologi Universitas Andalas* 2(1): 43-49.
- Popkin BM, D'Anci KE, Rosenberg IH. 2010. Water, Hydration, and Health. *Nutrition Review* 68(8): 439-458.
- Roncal-Jimenez C, Lanaspa MA, Jensen T, Sanchez-Lozada LG, Johnson RJ. 2015. Mechanism by Which Dehydration May Lead to Chronic Kidney Disease. *Annals of Nutrition and Metabolism* 66(3): 10-13.
- Simanjuntak. 2007. Radikal bebas dari Senyawa Toksik Karbon Tetraklorida. *Bina Widya* 18(1): 25-31.
- Szende B, Suba Z. 2000. *Introduction to Histopathology*. Hungary. Mediciana Publishing House Co. Hlm. 292.
- Wibowo M, Suharto G, Margawati A. 2012. Pengaruh Formalin Peroral Dosis Bertingkat Selama 12 Minggu Terhadap Gambaran Histopatologis Ginjal Tikus Wistar. *Jurnal Kedokteran Diponegoro* 1(1): 1-16.