

# IDENTIFIKASI SIRIP IKAN HIU YANG DIDAPAT DARI PENGUMPUL DI MINAHASA TENGGARA MENGGUNAKAN DNA BARCODE

*by* Stenly Wullur 15

---

**Submission date:** 20-Mar-2019 03:24PM (UTC+0700)

**Submission ID:** 1096520630

**File name:** Wehantouw.pdf (299.27K)

**Word count:** 2818

**Character count:** 16516

11

## IDENTIFIKASI SIRIP IKAN HIU YANG DIDAPAT DARI PENGUMPUL DI MINAHASA TENGGARA MENGGUNAKAN DNA BARCODE

(Identification of Shark Fins Collected from Fins Collector in Southeast Minahasa Using DNA Barcode)

Andre Wehantouw<sup>1</sup>, Elvy Like Ginting<sup>1</sup>, Stenly Wullur<sup>1</sup>

3

1. Program Studi Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi, Manado.

e-mail : andre.wehantouw@yahoo.co.id

Global shark populations decline significantly due to massive uncontrol capture, slow reproductive and low fecundity rate of the species. Indonesia is one of the biggest contributors to the world's shark fin trade. The high trade activities have significant effect on shark populations and are the source of declining quality of marine ecosystem. Objective of the present study was to identify shark fins collected from fins collectors in Tumbak, Southeast Minahasa using DNA barcodes. Genomic DNA Extraction of dried fins was conducted following procedure DNeasy Blood & Tissue kit, Cytochrome Oxidase Subunit 1 (COI) gene amplification was performed using primer Fish BCL5 (TCAACYYATCAYAAAGATATYGGCAC) and HCO2198 (TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAA TCA). Sequence data were analysis using ABsequence3 and MEGA ver 6. Alignment of COI gene was done using BLAST integrated in GenBank. Collected shark fins were obtained from four different individuals. BLAST results showed that all shark fins identified as *Triaenodon obesus*. Maximum and total scores, E-value, percentage of query cover, and the percentage of identity, between 604-1245, 0.0, 70-99% and 92-99%, respectively.

**Keywords :** DNA Barcode, Shark fin, COI gene, North Sulawesi

Populasi ikan hiu global menunjukkan penurunan yang signifikan karena; penangkapan yang masif dan tak terkontrol, karakter biologi reproduksi yang lambat serta fekunditas yang rendah. Indonesia merupakan salah satu negara kontributor terbesar dalam perdagangan sirip ikan hiu dunia. Tingginya aktifitas perdagangan sirip tersebut berpengaruh terhadap populasi ikan hiu dan berdampak pada turunnya kualitas keseimbangan ekosistem laut. Tujuan penelitian ini untuk mengidentifikasi ikan hiu dari potongan sirip yang didapat dari pengumpul di Tumbak, Minahasa Tenggara menggunakan DNA barcode. Ekstraksi DNA genom sirip hiu kering dilakukan dengan menggunakan prosedur DNeasy Blood & Tissue kit, amplifikasi gen Cytochrome Oxidase Subunit 1 (COI) dilakukan dengan menggunakan primer Fish BCL5 (TCAACYYATCAYAAAGATATYGGCAC) dan HCO2198 (TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAA TCA). Pengolahan data sekuen dilakukan dengan menggunakan program ABsequence3 dan MEGA ver 6. Pencocokan karakter nukleotida gen COI dilakukan dengan menggunakan program nBLAST yang terintegrasi pada laman GenBank. Sampel sirip yang berhasil dikoleksi berasal dari 4 individu yang berbeda. Hasil nBLAST menunjukkan bahwa keempat sampel sirip hiu tersebut teridentifikasi sebagai spesies *Triaenodon obesus*. Nilai keakuratan pencejajaran sekuen, nilai dugaan, prosentase panjang nukleotida yang selaras, dan prosentase tingkat kemiripan, masing-masing pada nilai antara 604-1245, 0.0, 70-99% dan 92-99%.

**Kata kunci :** DNA Barcode, Sirip ikan hiu, Gen COI, Sulawesi Utara

### PENDAHULUAN

Teknik biologi molekuler dapat membantu keberlanjutan dunia hayati yang semakin terancam karena minimnya informasi genetik membuat spesies

dikhawatirkan punah sebelum dikenali. Efektifitas sistem dan teknik biologi molekuler sangat penting untuk konservasi sumberdaya genetik suatu spesies dengan tingkat akurasi yang

tinggi dalam upaya kelestarian makhluk hidup. Metode identifikasi spesies makhluk hidup telah berkembang mulai dari identifikasi morfologi sampai pada identifikasi molekuler berdasarkan pada potongan DNA pendek yang disebut DNA Barcode (Hebert *et al.* 2003). DNA Barcode merupakan suatu teknik identifikasi spesies, aplikasinya mirip dengan teknologi pemindaian Barcode pada produk komersial. Gen pengkode protein yang digunakan untuk identifikasi spesies adalah gen *Cytochrome c oxidase I* (COI). COI merupakan sekuen gen pendek yang dipilih diantara banyaknya gen yang digunakan sebagai gen standar identifikasi khusus untuk spesies hewan berbasis DNA Barcode (Zein, 2007).

Populasi ikan hiu secara global menunjukkan penurunan yang signifikan sehubungan dengan adanya penangkapan ikan hiu yang masif dan tak terkontrol. Penurunan populasi ini makin diperparah dengan karakter biologi reproduksi ikan hiu yang lambat dalam mencapai masa kawin serta rendahnya fekunditas dari organisme ini (Carrier *et al.* 2010). Saat ini, hampir 90% spesies ikan hiu telah dikategorikan sebagai spesies yang terancam punah, langka dan dilindungi. Menurut data konsevasi yang dipublikasikan oleh International Union for Conservation of Nature (IUCN) red list, Indonesia dihuni oleh sekitar 118 spesies dari 200 spesies ikan hiu yang ada, dan dilaporkan sebagai negara kontributor terbesar sirip ikan hiu dunia dengan produksi antara 60.000 – 100.000 ton/tahun (Sadidi, 2013). Tingginya aktifitas perdagangan sirip ikan hiu tentu berpengaruh besar terhadap populasi ikan hiu lokal hingga global, yang berdampak pada turunnya kualitas keseimbangan ekosistem laut (Carrier *et al.* 2010). Oleh karena itu identifikasi yang akurat untuk spesies ikan hiu hasil tangkapan atau yang diperdagangkan sangat perlu dilakukan, sebagai acuan dasar dalam penentuan status konservasi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi ikan hiu dari potongan sirip yang didapat dari

pengumpul di Tumbak, Minahasa Tenggara melalui teknik DNA Barcode.

## METODE PENELITIAN

Sirip hiu didapat dari desa Tumbak, Minahasa Tenggara, Sulawesi Utara. Jumlah potongan sirip hiu yang berhasil diperoleh sebanyak empat potong sirip yang berasal dari individu berbeda. Analisis tampakan fisik dan molekuler sirip ikan hiu dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Farmasitika Laut, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi, Manado.

Ekstraksi DNA genom sirip ikan hiu dilakukan dengan mengikuti prosedur *DNeasy Blood & Tissue kit* ([www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)). Sampel dilisis menggunakan buffer ATL dan DNA total dari sampel dipisahkan dari protein dan debris menggunakan proteinase K dan buffer AL. DNA total dikoleksi menggunakan *DNeasy mini spin kolom* dilanjutkan dengan proses pemurnian DNA menggunakan buffer AW1 dan buffer AW2. DNA total yang terkoleksi dalam spin filter dipindahkan ke *elution tube* yang telah disiapkan dengan menggunakan buffer AE.

Amplifikasi gen COI menggunakan primer forward (Fish BCL5 TCAACYAATCAYAAAGATATYGGCAC) dan primer reverse (HCO2198 TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA). DNA diamplifikasi menggunakan 5 x HOT Firepol Master Mix. Total volume yang digunakan untuk amplifikasi adalah 25  $\mu$ L, yang terdiri atas 1  $\mu$ L DNA sampel dan 1  $\mu$ L volume dari masing-masing primer. Amplifikasi DNA menggunakan mesin PCR *TPersonal 120 metra* dengan pengaturan suhu sebagai berikut: predenaturasi pada suhu 95°C selama 2 menit, denaturasi pada suhu 95°C selama 40 detik dilakukan sebanyak 37 siklus, annealing pada suhu 50°C selama 40 detik 37 siklus, elongasi pada suhu 72°C selama 40 detik sebanyak 37 siklus dan 1 siklus perpanjangan akhir pada suhu 72°C selama 1 menit.

Keberhasilan amplifikasi gen COI diperiksa menggunakan gel berkonsentrasi 1% yang ditambahkan dengan maestrosafe prestained sebanyak 2  $\mu\text{L}$ . Produk amplifikasi DNA sebanyak 4  $\mu\text{L}$  dan 1  $\mu\text{L}$  10x loading buffer dan dimasukkan dalam masing-masing sumur yang telah disiapkan dalam gel. Pada salah satu sumur dalam gel diisi dengan 2  $\mu\text{L}$  ladder DNA marker (1 kb). Elektroforesis menggunakan 1x TBE buffer dan dialiri dengan tegangan listrik sebesar 80 volts dengan waktu kurang lebih 20 menit. Hasil pemeriksaan gel elektroforesis diamati lewat sinar UV-transluminator yang diikuti dengan dokumentasi. Produk amplifikasi yang menunjukkan adanya pita pada panjang basa sekitar 600-700 bp selanjutnya dikirim ke jasa pelayanan sekvensing FIRST BASE, Malaysia.

Hasil sekvensing dari spesimen sirip hiu didapat dalam bentuk kromatogram, hasil sekvens dua arah menggunakan primer forward dan reverse. Kualitas hasil sekvens dianalisis menggunakan program ABsequence3, diantaranya kualitas hasil sekvens ditentukan pada QV<sup>+20</sup> (quality value lebih besar dari 20) dan CRL (continuous read length). Penyusunan DNA consensus menggunakan perangkat lunak MEGA ver.6, yang meliputi; proses trimming, reverse compliment dan alignment. Proses alignment dilakukan dengan bantuan software MUSCLE yang terintegrasi dalam program MEGA 6 (Tamura et al. 2013). Sekvens yang telah melalui proses alignment, selanjutnya dicocokan ke database nukleotida yang terdapat pada situs database nukleotida cara online, yaitu situs GenBank National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sekvens DNA consensus dicocokkan ke database genbank dengan menggunakan fasilitas nucleotida blast yang terintegrasi di laman GenBank. Hasil BLAST umumnya menghasilkan lebih dari 1 satu sekvens yang bersesuaian. Informasi dari hasil BLAST tersebut berupa Score, Query Coverage, E-value dan Identity. Nilai

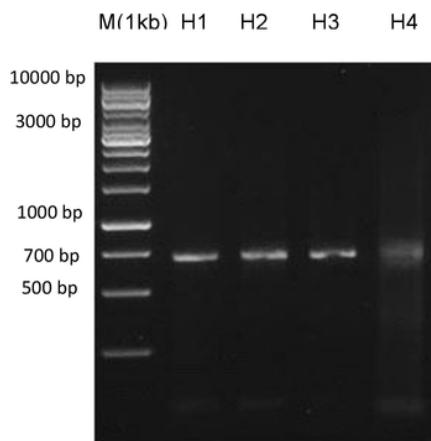
<sup>1</sup> score menunjukkan keakuratan nilai penjajaran sekvens berupa nukleotida yang tidak diketahui dengan sekvens nukleotida yang terdapat di dalam GenBank. Semakin tinggi nilai score yang diperoleh maka semakin tinggi tingkat homologi kedua sekvens. Query coverage adalah persentasi dari panjang nukleotida yang selaras dengan karakter nukleotida dalam database. Identity adalah nilai tertinggi dari persentasi identitas atau kecocokan antara sekuen query dengan sekuen database yang tersejajarkan. Nilai Expect value merupakan nilai dugaan yang memberikan ukuran statistik yang signifikan terhadap kedua sekuen. Nilai E-value yang semakin tinggi menunjukkan tingkat homologi antar sekvens akan semakin rendah, sedangkan nilai E-value yang semakin rendah menunjukkan tingkat homologi antar sekvens akan semakin tinggi. Nilai E-value bernilai 0 (nol) menunjukkan bahwa kedua sekvens tersebut identik (Claverie dan Notredame, 2003).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Total sirip hiu yang diperoleh dari pengumpul yang ada di Tumbak Minahasa Tenggara, berjumlah empat sirip dari individu berbeda. Bentuk dan tampakan keempat sirip hiu tersebut ditampilkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Bentuk dan tampakan sirip ikan hiu yang didapat di Tumbak Minahasa Tenggara.



Gambar 2. Hasil eletroforesis produk PCR gen COI dari spesimen sirip ikan hiu

Hasil ekstraksi DNA genom sirip ikan hiu telah digunakan sebagai DNA template dalam proses amplifikasi gen COI. Elektroforesis produk PCR (Gambar 2) menunjukkan adanya pita DNA pada masing-masing lintasan sampel DNA yang teramat pada posisi panjang amplikon sekitar 600-700 bp dengan menggunakan ukuran 1 kb DNA ladder sebagai pembanding. Posisi panjang amplikon tersebut sesuai dengan posisi panjang basa gen COI yang banyak digunakan sebagai penanda universal dalam identifikasi spesies hewan menurut Habert *et al* (2003).

Analisa kualitas hasil sekuening menunjukkan bahwa nilai QV<sup>+20</sup> dan CRL sirip hiu kode H1, H3 (for) dan H4 berada

di atas 500 nukleotida, sedangkan sirip hiu kode H2 dan H3 (rev) menunjukkan nilai yang lebih rendah, yaitu antara 146-294 nukleotida (Tabel 1).

Hasil pengurutan DNA gen COI selanjutnya disunting menggunakan perangkat lunak MEGAv6. DNA consensus masing-masing specimen telah disusun dengan melakukan pemotongan basa berkualitas kurang baik. Hasil penyusunan DNA consensus dari masing-masing spesimen telah diubah ke dalam format FASTA dan mendapatkan sejumlah urutan nukleotida, selanjutnya urutan nukleotida masing-masing spesimen dicocokkan dengan laporan urutan DNA yang terdokumentasi di GanBank (NCBI).

Hasil BLAST di situs GenBank menggunakan DNA consensus sirip hiu kode H1, H2, H3 dan H4 mendapatkan sejumlah laporan (100 hits) yang memiliki skor kemiripan yang tinggi, yaitu pada kisaran lebih besar 200 nukleotida. Cuplikan laporan teratas hasil BLAST DNA consensus gen COI sirip hiu H1, H2, H3, dan H4 ditampilkan pada Tabel 2. Hasil BLAST sekvens sirip hiu H2 yang menunjukkan skor keakuratan pensejajaran sekvens 604, prosentase panjang nukleotida selaras 70% dan prosentase tingkat kemiripan sekvens 92% dan merujuk pada spesies *Triaenodon obesus*. Hasil BLAST sirip hiu kode H1, H3 dan H4 menunjukkan skor keakuratan pensejajaran sekvens

Tabel 1. Kualitas hasil sekuening sirip ikan hiu yang dianalisis menggunakan program ABsequence. CRL (continuous read length) dan QV (quality value +20).

No	Kode Sampel	Primer	CRL	QV20+
1	H 1	For	649	651
		Rev.	650	656
2	H 2	For.	146	294
		Rev.	157	266
3	H 3	For.	646	648
		Rev.	160	155
4	H 4	For.	588	603
		Rev.	606	588

Tabel 2. Cuplikan hasil penelusuran teratas menggunakan sekuen gen COI sirip hiu kode H1, H2, H3 dan H4 di situs GenBank (tanggal akses 31 Januari 2017).

Description	Max Score	Total Score	Query cover	E-value	Identiti	Acc. numb
<b>Sirip hiu kode H1</b>						
Triaenodon obesus mitochondrion, complete genome	1245	1245	99%	0.0	99%	KJ7483 76.1
Triaenodon obesus cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial; mitochondrial	1223	1223	95%	0.0	99%	KM3969 47.1
Triaenodon obesus voucher IBRC.01.70.02 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1208	1208	93%	0.0	100%	KF5903 61.1
Triaenodon obesus voucher NBFGR:CHN:NC1 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial 8 s; mitochondrial	1205	1205	93%	0.0	99%	KF8997 64.1
Triaenodon obesus voucher SOSSRC:Triaenodon obesus OC-2 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1205	1205	93%	0.0	100%	FJ51928 8.1
<b>Sirip 2 u kode H2</b>						
Triaenodon obesus haplotype 40_57 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	604	604	70%	6e-169	92%	KT2752 39.1
Triaenodon obesus haplotype 39_56 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	604	604	70%	6e-169	92%	KT2752 38.1
Triaenodon obesus haplotype 38_54 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	604	604	70%	6e-169	92%	KT2752 37.1
Triaenodon obesus haplotype 37_53 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	604	604	70%	6e-169	92%	KT2752 36.1
Triaenodon obesus haplotype 36_52 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	604	604	70%	6e-169	92%	KT2752 35.1
<b>Sirip hiu kode H3</b>						
Triaenodon obesus mitochondrion, complete genome	1177	1177	100%	0.0	99%	KJ7483 76.1
Triaenodon obesus voucher CYO-19 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1162	1162	99%	0.0	99%	KC9705 12.1
Triaenodon obesus cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial; mitochondrial	1151	1151	96%	0.0	99%	KM3969 47.1
Triaenodon obesus voucher IBRC.01.70.02 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1147	1147	96%	0.0	100%	KF5903 61.1
Triaenodon obesus voucher NBFGR:CHN:NC1 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1142	1142	96%	0.0	99%	KF8997 64.1
<b>Sirip hiu kode H4</b>						
Triaenodon obesus mitochondrion, complete genome	1155	1155	99%	0.0	99%	KJ7483 76.1
Triaenodon obesus voucher CYO-19 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1146	1146	100%	0.0	99%	KC9705 12.1
Triaenodon obesus cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial; mitochondrial	1144	1144	98%	0.0	99%	KM3969 47.1
Triaenodon obesus voucher IBRC.01.70.02 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1140	1140	97%	0.0	100%	KF5903 61.1
Triaenodon obesus voucher NBFGR:CHN:NC1 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1134	1134	97%	0.0	99%	KF8997 64.1

(>1000), prosentasi panjang nukleotida selaras (93-100%), prosentase tingkat kemiripan sekuen (99-100%) yang tinggi, dan nilai dugaan (0.0) yang rendah

yang mengindikasikan tingkat kemiripan yang tinggi dengan spesies *Triaenodon obesus*. Drancourt *et al.* (2000), dalam Asnani *et al.* (2015) menambahkan



Gambar 3. Struktur tubuh *Triaenodon obesus* (White et al. 2006).

bahwa prosentase tingkat kemiripan sekuen yang berada pada nilai  $\geq 99\%$  menunjukkan bahwa spesies yang dibandingkan merupakan spesies yang sama.

*T. obesus* merupakan jenis hiu yang berkeliaran dekat terumbu karang, dan dikenal dengan nama Whitetip Reef Shark. Menurut White et al. (2006), spesies ini mempunyai ciri umum yaitu, ujung sirip punggung<sup>5</sup> dan ujung sirip ekor berwarna putih, Panjang tubuh dapat mencapai 200 cm, pada ikan jantan dan betina dewasa berukuran 105–120 cm. Spesies ini biasa dijumpai diseluruh perairan Indo-Pasifik, hidup di daerah pantai atau dasar perairan yang berlubang dan didaerah terumbu karang yang berair jernih, dengan kedalaman antara 1-40 m. Menurut data konservasi internasional yaitu data IUCN (international Union for Conservation Nature) Redlist spesies ini berada di kategori near threatened atau hampir terancam (Gambar 3).

## KESIMPULAN

Hasil koleksi sirip ikan hiu di Tumbak, Minahasa Tenggara, Sulawesi Utara mendapatkan 4 spesimen sirip yang berasal dari individu yang berbeda. Identifikasi molekuler masing-masing sirip menggunakan teknik DNA barcode menunjukan bahwa keempat spesies tersebut merujuk pada spesies *Triaenodon obesus*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Asnani, A., Ryandini, D., Suandri. 2015. Karakterisasi dan identifikasi spesies *actinomisetes* k-3e. DOI: 10.13140/RG.2.1.4469.1922.
- <sup>17</sup> Carrier, J.C., Musick, J.A., Heithaus, M.R. 2010. *Shark and their relatives II: Biodiversity, adaptive physiology and conservation*. CRC Press Boca Raton London New York..
- <sup>15</sup> Claveire, J.M., Notredame,C. 2003. *Bioinformatics for Dummies*. Wiley Publishing, Indianapolis.
- <sup>10</sup> Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S. L. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512):313-321.
- <sup>23</sup> IUCN-SSC. 2001. *IUCN Red list categories and criteria* IUCN-The World Conservation Union. Gland. Switzerland and Cambridge. <http://www.iucnredlist.org/>.
- <sup>7</sup> NCBI. 1988. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine.[Computer software]. [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).
- <sup>24</sup> Qiagen. 2006. *DNeasy Blood and Tissue Handbook: DNeasy Blood and Tissue Kit, DNeasy 96 Blood & Tissue Kit*. [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Sadidi, D. 2013. Upaya Meningkatkan Konservasi Ikan Hiu. <http://didisadili.blogspot.co.id/2013/12/upaya-meningkatkan-konservasi-ikan-hiu.html>. diakses januari 2016.

22

Tamura K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A.. Kumar, S. 2013. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. [Computer software]. *Molecular Biology and Evolution*. 30:2725-2729.

9

White, W.T., Last, P.R., Stevens, J.D. Yarsley, G.K., Fahmi, Darmadi. 2006. *Economically important shark & rays Indonesia*. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia 2601. 327.

Zein, M.S.A. 2007. *DNA barcode keragaman genetic, dan konservasi fauna Indonesia*. Laboratorium genetika bidang zoology pusat peneliti biologi LIPI. 70 hal.

# IDENTIFIKASI SIRIP IKAN HIU YANG DIDAPAT DARI PENGUMPUL DI MINAHASA TENGGARA MENGGUNAKAN DNA BARCODE

## ORIGINALITY REPORT



## PRIMARY SOURCES

1	<a href="http://media.unpad.ac.id">media.unpad.ac.id</a>	5%
2	<a href="http://ceiba.biosci.arizona.edu">ceiba.biosci.arizona.edu</a>	4%
3	<a href="http://Submitted to Universitas Sam Ratulangi">Submitted to Universitas Sam Ratulangi</a>	3%
4	<a href="http://meme.ebi.edu.au">meme.ebi.edu.au</a>	1%
5	<a href="http://ageconsearch.umn.edu">ageconsearch.umn.edu</a>	1%
6	<a href="http://es.scribd.com">es.scribd.com</a>	1%
7	<a href="http://Submitted to Univerza v Ljubljani">Submitted to Univerza v Ljubljani</a>	1%
8	<a href="http://rda.ebi.edu.au">rda.ebi.edu.au</a>	1%

9	zenodo.org Internet Source	1 %
10	studylib.net Internet Source	1 %
11	Submitted to Pukyong National University Student Paper	<1 %
12	anzdoc.com Internet Source	<1 %
13	bioweb.wku.edu Internet Source	<1 %
14	digre.pmf.unizg.hr Internet Source	<1 %
15	www.owlnet.rice.edu Internet Source	<1 %
16	ar.scribd.com Internet Source	<1 %
17	library.umac.mo Internet Source	<1 %
18	docplayer.info Internet Source	<1 %
19	docobook.com Internet Source	<1 %
20	npa.newtonpaiva.br Internet Source	<1 %

<1 %

---

21	dipollina.blogautore.repubblica.it Internet Source	<1 %
22	repositori.uin-alauddin.ac.id Internet Source	<1 %
23	jim.unsyiah.ac.id Internet Source	<1 %
24	Submitted to University of Iowa Student Paper	<1 %

---

Exclude quotes

On

Exclude matches

Off

Exclude bibliography

On