

UJI TOKSISITAS KITOSAN SISIK IKAN HARUAN (CHANNA STRIATA) TERHADAP SEL VERO

by Deby Kania Tri Putri

Submission date: 23-May-2023 03:43PM (UTC+0700)

Submission ID: 2099927626

File name: S_KITOSAN_SISIK_IKAN_HARUAN_CHANNA_STRIATA_TERHADAP_SEL_VERO.pdf (435.56K)

Word count: 2456

Character count: 15104

PENDAHULUAN

Penyakit periodontal merupakan salah satu masalah penyakit mulut yang masih perlu mendapat perhatian. Riskesdas (2018) menyatakan persentase penduduk yang mempunyai masalah penyakit periodontal mencapai 57,6%. Penyakit tersebut termasuk penyakit dengan penderita tertinggi kedua setelah karies. Penyakit periodontal dimulai dari adanya plak yang menempel pada permukaan gigi. Mekanisme plak didahului terbentuknya *acquired pellicle* pada permukaan gigi yang berwarna transparan. Pelikel terdiri dari glikoprotein yang diendapkan oleh saliva yang terbentuk setelah penyikatan gigi, diikuti dengan adhesi awal bakteri planktonik pada lapisan pelikel pada daerah perikatan, selanjutnya yaitu pematangan bakteri *biofilm* dan *biofilm* berdiversifikasi dengan melepaskan sel/kelompok sel.^{1,2} Plak merupakan masalah utama dalam rongga mulut yang dapat menimbulkan penyakit infeksi pada jaringan lunak seperti gingivitis dan periodontitis. Bakteri yang terlibat antara lain *Streptococcus sanguinis* dan *Porphyromonas gingivalis*. Salah satu penyakit periodontal yang sering ditemui di masyarakat adalah periodontitis.³

Periodontitis merupakan penyakit multifaktorial penyebab peradangan pada jaringan periodontal, periodontitis disebabkan oleh bakteri pemicu penyakit infeksi pada jaringan penyangga gigi, penyakit tersebut dapat mengakibatkan kerusakan tulang alveolar dan ligamen periodontal yang membentuk poket atau terjadinya resesi maupun keduanya. Prevalensi periodontitis di Indonesia diketahui sekitar 74,1%.^{4,5} Perawatan periodontitis umumnya dilakukan secara kimia dengan obat-obatan dan secara mekanis dengan *Scaling Root Planning* yaitu menghilangkan deposit keras dan lunak serta bakteri yang menempel pada permukaan gigi dan dalam gingiva, sehingga mengeliminasi bakteri. Pemberian antimikroba secara sistemik per oral ataupun lokal dianjurkan untuk meningkatkan hasil terapi SRP.⁶

Keanekaragaman ikan air tawar di Indonesia sangat tinggi bahkan di Asia maupun di dunia. Zona zoografi Kalimantan Selatan ditemukan 24 famili ikan air tawar salah satunya *Channidae*. Ikan haruan (*Channa striata*) merupakan salah satu jenis ikan yang banyak dikonsumsi.⁷ Limbah ikan haruan sangat melimpah dan belum dimanfaatkan secara optimal serta berdaya guna, bahkan sebagian besar merupakan buangan yang juga turut mencemari lingkungan.⁸ Salah satu alternatif upaya pemanfaatan limbah ikan haruan agar dapat memiliki nilai dan daya guna menjadi produk yang bernilai ekonomis tinggi adalah dengan pengolahan limbah sisik ikan haruan menjadi kitosan.⁹

Kitosan merupakan bahan yang mempunyai sifat biokompatibilitas, biodegradabilitas, bioadesi, dan bersifat non toksik terhadap sel mamalia.¹⁰ Kitosan sisik ikan haruan memiliki potensi sebagai bahan antimikroba, karena mengandung enzim lisosim dan gugus *aminopolysacharida* yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba.¹¹ Kemampuan kitosan sisik ikan haruan dalam menekan pertumbuhan bakteri disebabkan karena memiliki polikation bermuatan positif yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri.³ Kandungan yang dimiliki oleh kitosan sisik ikan haruan salah satunya adalah gugus amina. Gugus amina yang terkandung dalam kitosan memiliki efek toksik untuk sel yang dipengaruhi oleh dosis dan konsentrasi paparan bahan kimia yang diberikan.¹² Syarat bahan yang boleh dipergunakan dalam kedokteran gigi adalah tidak toksik. Oleh karena itu, diperlukan penelitian untuk menguji toksisitas bahan sebagai bahan *screening standart* yang digunakan dalam kedokteran gigi.¹³

Salah satu metode untuk menguji nilai toksisitas suatu material adalah metode *MTT assay*. Tes ini didasarkan pada kemampuan sel hidup untuk mereduksi garam *MTT* yang berwarna kuning dan larut ke dalam deposit formazan yang ungu dan tidak larut.¹⁴ Sampel penelitian yang digunakan dalam penelitian adalah sel vero. Hasil tes menggunakan sel vero dapat digunakan sebagai dasar untuk pengujian yang akurat.¹⁵ Parameter uji toksisitas adalah nilai IC_{50} yakni nilai konsentrasi yang menghambat pertumbuhan pada sel sebanyak 50% dari populasi sel dan membuktikan potensi toksik suatu senyawa terhadap sel.^{14,16} Berdasarkan hal di atas maka perlu dilakukan penelitian tentang uji toksisitas sel vero setelah diberikan kitosan sisik ikan haruan.

METODE PENELITIAN

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *true experimental* atau eksperimental murni dengan rancangan *posttest only with control group design*. Penelitian ini telah dinyatakan laik etik oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Lambung Mangkurat dengan No. No. 051/KEPKG-FKGULM/EC/III/2021. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biomedik Universitas Lambung Mangkurat Banjarmasin untuk pengambilan bahan kitosan dan Laboratorium Dengue Universitas Airlangga Surabaya untuk uji toksisitas kitosan sisik ikan haruan. Penelitian ini menggunakan 6 kelompok sampel 4 kelompok perlakuan dan 2 kelompok kontrol dengan pengulangan 4 kali.

Alat dan Bahan

Bahan untuk penelitian ini yaitu kitosan, sel vero, media MEM, MTT, FBS 10% untuk kultur sel, *trypsin*-EDTA dan *dimetil sulfoksida* (DMSO) untuk melarutkan ekstrak dalam medium dan sebagai larutan *stopper*. Alat yang digunakan pada penelitian yaitu sentrifugal *plc series*, blender, kertas saring *wimann no. 1*, *autoclave*, *microplate 96 well*, inkubator CO₂, *laminary air flow*, *flask*, *conical tube*, *yellow tip*, sentrifugal, ELISA *reader*, mikropipet, hemositometer dan mikroskop *inverted*.

Pembuatan Kitosan

Pada tahap deproteinasi, isolasi kitin sisik ikan yang sudah hancur dilakukan pencucian. Sisik ditempatkan di 1000 ml gelas dan direndam dalam natrium hidroksida yang mendidih (4% b/v) dalam satu jam yang bertujuan untuk melarutkan protein dan gula dan didapatkan kitin mentah. Larutan NaOH 4% dengan perbandingan serbuk dan larutan yaitu 1:4 b/v untuk persiapan kitin. Sampel direbus dalam natrium hidroksida, gelas kimia yang mengandung sampel sisik ikan dan didinginkan selama 30 menit pada suhu kamar dan dilakukan penyaringan residu sampel. Sampel dicuci berkali-kali menggunakan aquades hingga mendapatkan *pH* netral.¹⁹ Selanjutnya, residu sampel disaring kembali dan dimasukkan kedalam oven dikeringkan selama 24 jam dengan suhu 50°C. Selanjutnya dilakukan penimbangan sampel hasil deproteinasi dan dilakukan pencatatan.¹¹ Sisik-sisik didemineralisasi dengan 1% HCl perbandingan serbuk dan larutan 1:4 b/v dan direndam 24 jam untuk menghapus mineral. Residu sampel disaring dan sampel dicuci berkali-kali menggunakan aquades hingga *pH* netral. Selanjutnya sampel yang sudah netral dimasukkan kedalam oven selama 24 jam dengan suhu 50°C dan dilakukan penimbangan pada sampel hasil demineralisasi dan dilakukan pencatatan kembali. Senyawa kitin sebelum diubah menjadi kitosan harus melalui deasetilasi.¹¹ Kitin direaksikan dengan I₂-KI 1% yang memberikan warna kuning kecokelatan, kemudian ditambahkan H₂SO₄ 1 M menjadi warna merah keunguan. Perubahan warna dari kuning kecokelatan menjadi merah keunguan menunjukkan adanya kitin.¹¹ Proses deasetilasi menggunakan larutan NaOH 50% dengan perbandingan serbuk dan larutan yaitu 1:4 b/v dan direbus selama 2 jam dengan suhu 100° di *hot plate*. Sampel didinginkan selama 30 menit di suhu kamar. Sampel dicuci dengan NaOH 50 % yang sudah dingin dan disaring residunya. Kemudian, sampel dicuci dengan aquades hingga *pH* netral dan disaring untuk mempertahankan zat padat, yaitu kitosan. Sampel kemudian dikeringkan di dalam oven selama 24 jam pada suhu 50°C dan

dilakukan penimbangan. Kitosan yang diperoleh dari hasil deasetilasi dalam bentuk serbuk berwarna putih.¹⁷

Persiapan Sel Vero

Tahapan penyiapan kultur sel petama menyiapkan sel vero dalam keadaan beku lalu cairkan di waterbath dengan suhu 37°C. Kedua pembuatan kultur sel vero dengan media MEM dan FBS 10% inkubasi selama 48 jam sampai sel memenuhi botol lalu buang medium. Ketiga cuci sel menggunakan larutan PBS untuk menguraikan gumpalan sel. Keempat ditambahkan *trypsin*-EDTA sebanyak 1 ml dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 2-3 menit sampai terlihat ada tanda sel mulai terlepas dari *flask* sel. Kelima 5 ml media kultur MEM disuplementasi dengan 10% *Fetal Bovine Serum* (FBS) ditambahkan agar *trypsin*-EDTA menjadi tidak aktif. Keenam sel dibilas di dalam media dengan menggunakan pipet secara perlahan untuk menguraikan gumpalan sel. Suspensi sel dipindahkan dari *flask* ke dalam *conical tube* 15 ml steril kemudian disentrifugasi selama 5 menit pada suhu ruangan. Ketujuh supernatan dibuang dari suspensi sel kembali menggunakan 10 ml MEM dengan 10% FBS. Pengenceran sel yang diinginkan dipersiapkan dari total 12-20 ml MEM dengan 10% FBS dan ditambahkan ke dalam *flask* kultur sel.¹⁸

Metode MTT assay

Tahapan uji toksisitas kitosan sisik ikan haruan pertama sediaan sel vero yang telah siap dalam *microplate well* (Kolom 1 adalah kontrol sel (KS), 4 sampel dengan 4 kali perlakuan. Kedua beri perlakuan pada sel vero dengan kitosan sisik ikan haruan sesuai konsentrasi yaitu 20%, 40%, 75% dan 100% serta kontrol media sebanyak 0,25 µL untuk setiap well. Ketiga inkubasi selama 24 jam dengan menggunakan inkubator CO₂. Keempat setelah diinkubasi, sampel dibuang dan ditambahkan larutan media MEM dan FBS dibuang pada botol penampung. Kelima *microplate* di cuci dengan PBS sebanyak 3 kali, ini bertujuan membuang sisa serum yang tersisa. Keenam ditambahkan reagen MTT sebanyak 10 µL untuk setiap well. Ketujuh inkubasi kembali selama 4 jam menggunakan inkubator CO₂. Kedelapan setelah inkubasi, larutan MTT dibuang dan reaksi antara MTT dengan sel dihentikan dengan pemberian *stopper* DMSO. Kesembilan *microplate* di shaker selama 5 atau 10 menit agar penghentian reaksi dapat terjadi secara merata pada setiap sel sehingga mengeluarkan formazan.¹⁸

Uji Toksisitas Menggunakan ELISA reader

Microplate well dimasukkan ke dalam ELISA reader dengan panjang gelombang 595 nm untuk

proses pembacaan viabilitas sel. Kesebelas matikan kembali ELISA reader lalu buat catat data absorbansi. Kedua belas hitung persentase viabilitas sel dan analisis menggunakan IC₅₀ dengan SPSS (Analisis probit) dengan menggunakan rumus persentase viabilitas $\frac{(ODP-ODM) \times 100\%}{(ODK-ODM)}$. Ketiga belas setelah dilakukan uji toksisitas, dilakukan pembuangan kultur sel vero.¹⁸

HASIL

Pengujian dilakukan dengan menggunakan alat ELISA reader untuk membaca nilai absorbansi sel hidup. Keempat sampel perlakuan dengan kontrol sel serta kontrol media.



Gambar 1. Rata-rata Absorbansi Kitosan Sisik Ikan Haruan Terhadap Sel Vero.

Berdasarkan grafik tersebut dapat dilihat rata-rata presentase viabilitas sel vero dari berbagai konsentrasi kitosan sisik ikan haruan. Dosis yang menunjukkan penghambatan pertumbuhan sel vero hingga 50% (IC₅₀) dihitung berdasarkan dosis dan persentase penghambatan oleh senyawa uji dengan analisis probit.



Gambar 2. Grafik Rerata Jumlah Viabilitas Sel Vero Hidup Pada Setiap Perlakuan.

Berdasarkan grafik tersebut menunjukkan bahwa setiap kenaikan konsentrasi kitosan sisik ikan haruan selalu diikuti dengan kenaikan presentase viabilitas sel. Semakin tinggi konsentrasi larutan uji maka semakin tinggi presentase viabilitas pada sel vero. Nilai viabilitas sel terbesar adalah konsentrasi 100% dan 75% sebesar 100%, 40% sebesar 81,4% dan konsentrasi 20% sebesar 68,1%. Kitosan dengan konsentrasi 20%, 40%, 75% dan 100% dikatakan tidak toksik dikarenakan viabilitas sel $\geq 60\%$.¹⁹

Tabel 1. Hasil Analisis SPSS.

Nilai IC ₅₀	Lower Bound	Upper Bound
93103,354 µg/mL	-38159,934 µg/mL	166442,707 µg/mL

Hasil uji probit didapatkan nilai pada penelitian ini adalah IC₅₀ 93103,354 µg/mL dengan lower bound -38159,934 µg/mL dan upper bound 166442,707 µg/mL. Menurut Balantye dalam Mardja dkk, (2016) IC₅₀ berkisar >1000 µg/mL dikategorikan tidak toksik, sehingga dapat disimpulkan bahwa kitosan sisik ikan haruan tidak bersifat toksik terhadap sel vero.

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan uji toksisitas kitosan sisik ikan haruan dan dilakukan dengan metode MTT assay. Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan nilai IC₅₀ yaitu konsentrasi yang mampu menghambat sel sebanyak 50% dari populasinya.²⁰ Nilai IC₅₀ dapat digunakan untuk mengetahui apakah kitosan sisik ikan haruan bersifat toksik terhadap sel vero.

Nilai IC₅₀ didapatkan setelah sel vero diberikan pewarnaan dengan menggunakan metode MTT assay kemudian diukur dengan ELISA reader. Sel vero ini berasal dari sel ginjal yang normal. Karena sel tidak berubah, mereka tidak kehilangan contact inhibition. Ketika sel-sel ini mencapai contact inhibition, mereka berhenti tumbuh dan mulai mati. Oleh karena itu, sangat penting untuk memantau sel vero dan melakukan subkultur mereka karena mereka membentuk monolayers konfluen. Kultur sel vero yang tumbuh secara aktif berlipat ganda kira-kira setiap 24 jam.¹⁸

Prinsip metode MTT assay adalah pereduksian garam tetrazolium MTT yang berwarna kuning oleh sistem reduktase. Reagen MTT yang berpaparan dengan sel hidup akan berwarna ungu serta tidak larut dalam air pada sel hidup, sehingga semakin banyak intensitas warna ungu yang dihasilkan maka jumlah sel yang hidup semakin banyak. Hal ini dikarenakan reagen MTT yang berpaparan dengan sel hidup berubah menjadi garam formazan yaitu suksinat tetrazolium yang termasuk dalam rantai respirasi mitokondria yang menghasilkan enzim dehidrogenase membentuk kristal formazan.^{22,23}

Kitosan terdiri atas tiga gugus fungsional reaktif, gugus amino baik gugus hidroksil primer maupun sekunder. Gugus amino (NH₂) dan gugus hidroksil (OH) di dalam kitosan merupakan kunci gugus fungsional dari aktifitas antioksidan pada kitosan.¹² Kitosan dari sisik ikan haruan mengandung senyawa antioksidan yang dapat menurunkan aktivitas radikal bebas seperti hidrogen peroksida, anion superoksida, dan ion Cu²⁺ dengan cara berikatan dengan ion-ion radikal

bebas. Antioksidan pada kitosan memiliki dua mekanisme dalam menghambat proses reaksi dari radikal bebas. Mekanisme pertama yaitu dengan cara melepaskan elektron dari antioksidan sehingga berikatan dengan radikal bebas dan mengubahnya menjadi bentuk molekul yang stabil. Mekanisme kedua yaitu dengan melepaskan ion hidrogen dari antioksidan dan berikatan dengan radikal bebas. Tubuh manusia secara alami memiliki sistem antioksidan dalam tubuhnya, namun apabila radikal bebas pada tubuh bertambah maka tubuh juga memerlukan antioksidan tambahan.²⁴

Antioksidan dari kitosan dapat sebagai bahan antioksidan alternatif apabila terbukti tidak toksik. Toksisitas dari kitosan sendiri dapat diketahui dengan melihat derajat deasetilasi apabila lebih dari 35% menunjukkan toksisitas yang rendah, sedangkan apabila derajat deasetilasinya dibawah 35% toksisitasnya bergantung pada dosis kitosan yang digunakan. Nilai kitosan menurut SNI adalah $\geq 75\%$, berdasarkan penelitian Putri dkk (2020) kitosan pada sisik ikan haruan memiliki derajat deasetilasi 85,25% yang berarti memiliki toksisitas rendah dan aktivitas antioksidan yang lemah.²⁵ Kitosan sisik ikan haruan memiliki sifat antioksidan yang rendah karena memiliki nilai $IC_{50} > 300$ ppm, oleh karena itu diperlukan kitosan dengan konsentrasi tinggi agar efek antioksidannya lebih kuat.²⁵

Hipotesis dari penelitian ini terbukti bahwa kitosan sisik ikan haruan terhadap sel vero memiliki nilai toksisitas IC_{50} tidak toksik. Nilai viabilitas sel terbesar adalah konsentrasi 100% dan 75% sebesar 100%, 40% sebesar 81,4% dan konsentrasi 20% sebesar 68,1%. Kitosan dengan konsentrasi 20%, 40%, 75% dan 100% dikatakan tidak toksik dikarenakan viabilitas sel $\geq 60\%$.¹⁹ Hal ini sejalan dengan penelitian Jacob dkk (2013) bahwa semakin rendah konsentrasi yang digunakan maka semakin rendah juga aktivitas antioksidan yang dapat mengakibatkan sel mati akibat paparan radikal bebas, sedangkan apabila semakin tinggi konsentrasi semakin tinggi juga aktivitas antioksidan yang mengakibatkan sel banyak yang hidup setelah diberi perlakuan.

Hasil dari penelitian didapatkan bahwa semakin tinggi konsentrasi kitosan sisik ikan haruan maka semakin pekat juga warna ungu yang dihasilkan yang berarti viabilitas sel vero bertambah seiring dengan penambahan konsentrasi dari kitosan sisik ikan haruan. Warna ungu dari enzim *dehidrogenase* ini yang menjadi acuan untuk mengetahui viabilitas sel. Hal ini dikarenakan semakin banyak terjadinya reaksi MTT yang berpaparan dengan sel hidup maka akan semakin banyak garam formazan atau *suksinat tetrazolium* yang akan menghasilkan

enzim *dehidrogenase* yang berwarna ungu dan tidak larut air dalam sel hidup.²² Kitosan sisik ikan haruan dengan konsentrasi yang lebih rendah seperti 20% dan 40% memiliki antioksidan yang rendah sehingga tidak mampu untuk menghambat atau menghentikan aktivitas radikal bebas yang mengakibatkan kitosan sisik ikan haruan mampu menurunkan viabilitas sel vero. Hal ini sejalan dengan penelitian Saputra dan Kroesnadi (2020) bahwa kitosan bisa bersifat toksik tetapi tingkat toksisitasnya bergantung pada sumber kitosan dan kadar konsentrasinya.

Kitosan memiliki sifat biokompabilitas yang baik, namun kualitasnya dinilai berdasarkan dari sumber kitosan, derajat deasetilasi, konsentrasi kitosan, dan metode pembuatan. Kitosan juga bermanfaat dalam bidang kedokteran gigi yaitu sebagai bahan antibakteri.^{10,11} Sel vero tetap memiliki viabilitas sel yang tinggi setelah dipaparkan kitosan sisik ikan haruan konsentrasi terutama 75% dan 100% yang berarti tidak bersifat toksik pada sel vero. Berdasarkan hasil analisis probit didapatkan nilai $IC_{50} > 1000$ $\mu\text{g/mL}$ dan dapat disimpulkan bahwa kitosan sisik ikan haruan tidak bersifat toksik pada sel vero. Berdasarkan hal di atas maka dapat disimpulkan bahwa kitosan sisik ikan haruan bersifat tidak toksik terhadap sel vero.

UJI TOKSISITAS KITOSAN SISIK IKAN HARUAN (CHANNA STRIATA) TERHADAP SEL VERO

ORIGINALITY REPORT

17%

SIMILARITY INDEX

15%

INTERNET SOURCES

4%

PUBLICATIONS

3%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	dspace.hangtuah.ac.id Internet Source	1%
2	eprints.unmas.ac.id Internet Source	1%
3	journal.unair.ac.id Internet Source	1%
4	Johanna A. Khoman, Miranti A. Minanga. "Perawatan Kuretase Gingiva Gigi Anterior pada Periodontitis: Laporan Kasus", e-GiGi, 2021 Publication	1%
5	Maryati Maryati, Ahmad Novian Nur Anas, Muhammad Nur Khairudin. "Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Heksan, Ekstrak Etil Asetat, Ekstrak Etanol Buah Mengkudu (Morinda citrifolia L) Terhadap Sel T47D", Pharmacon: Jurnal Farmasi Indonesia, 2020 Publication	1%
6	www.e-jurnal.com Internet Source	1%

7	repository.pimedu.ac.id Internet Source	1 %
8	repository.unhas.ac.id Internet Source	1 %
9	Submitted to Sriwijaya University Student Paper	1 %
10	es.scribd.com Internet Source	1 %
11	evolvindo.wordpress.com Internet Source	1 %
12	Rian Hidayat, Agianto Agianto, Rismia Agustina. "Transportasi Pasien Stroke ke Instalasi Gawat Darurat Rumah Sakit", Journal of Holistic Nursing Science, 2020 Publication	1 %
13	www.jurnalpertanianumpar.com Internet Source	1 %
14	Submitted to Universitas Indonesia Student Paper	<1 %
15	e-journal.biologi.lipi.go.id Internet Source	<1 %
16	nanopdf.com Internet Source	<1 %
17	uad.portalgaruda.org Internet Source	

<1 %

18

pdfs.semanticscholar.org

Internet Source

<1 %

19

Hazri Rizaldi, Febrianti Lestari, Susiana Susiana. "Tingkat kerusakan ekosistem mangrove di Kawasan Estuari Sei Jang Kecamatan Bukit Bestari Kota Tanjungpinang, Kepulauan Riau, Indonesia", *Akuatikisile: Jurnal Akuakultur, Pesisir dan Pulau-Pulau Kecil*, 2020

Publication

<1 %

20

e-journal.uajy.ac.id

Internet Source

<1 %

21

www.publikasi.weblog.esaunggul.ac.id

Internet Source

<1 %

22

etd.unsyiah.ac.id

Internet Source

<1 %

23

jurnal.pdgi.or.id

Internet Source

<1 %

24

jurnal.umpwr.ac.id

Internet Source

<1 %

25

repository.its.ac.id

Internet Source

<1 %

26

www.universitas-trilogi.ac.id

Internet Source

<1 %

27

brother-quiet.xyz

Internet Source

<1 %

28

eprints.unram.ac.id

Internet Source

<1 %

29

repositori.usu.ac.id

Internet Source

<1 %

30

repository.maranatha.edu

Internet Source

<1 %

31

www.bappeda.jambiprov.go.id

Internet Source

<1 %

Exclude quotes On

Exclude matches Off

Exclude bibliography On