

Efek Protektif Ekstrak Etanol Herba Pegagan (*Centella Asiatica* (L.) Urban) Terhadap Pembentukan Katarak Tikus Wistar Yang Diinduksi Sodium Selenit

By SAPTO YULIANI

**EFEK PROTEKTIF EKSTRAK ETANOL HERBA
PEGAGAN (*Centella asiatica* (L.) Urban) TERHADAP
PEMBENTUKAN KATARAK TIKUS WISTAR YANG
DIINDUKSI SODIUM SELENIT**

**THE PROTECTIF EFFECT OF ETHANOLIC
EXTRACT OF GOTU COLA HERB (*Centela Asiatica*)
TOWARD CATARACT FORMATION ON WISTAR
RAT INDUCED BY SODIUM SELENITE**

Sapto Yuliani

Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta

e-mail : syuliani@yahoo.com

Abstrak

Katarak adalah penyakit multifaktorial, stres oksidatif diduga sebagai faktor utama pemicu terjadinya katarak. Adanya senyawa yang mempunyai aktifitas antioksidan diharapkan dapat mencegah terjadinya katarak. Pegagan (*Centella asiatica*) mengandung senyawa asiatikosid yang memiliki sifat antioksidan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek protektif ekstrak etanol herba pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) terhadap pembentukan katarak tikus Wistar yang diinduksi sodium selenit. Penelitian ini menggunakan tikus Wistar umur 9 hari. Tikus dikelompokkan menjadi 6 kelompok, masing-masing kelompok 5 ekor. Kelompok pertama (kontrol sehat) disuntik aquabides. Kelompok ke-dua (kontrol sakit) disuntik larutan CMC-Na 1%. Kelompok ke-tiga disuntik Vitamin E dosis 378 IU/kg BB, kelompok ke-empat disuntik ekstrak etanol herba pegagan dosis pegagan 100 mg/kgBB secara. Kelompok ke-lima disuntik ekstrak etanol herba pegagan dosis 200 mg / kgBB. Kelompok ke-enam disuntik ekstrak etanol herba pegagan dosis 400 mg / kgBB. Pemberian perlakuan setiap hari selama 3 hari secara intraperitoneal. Empat jam kemudian, semua tikus diberi suntikan sodium selenit dosis tunggal 25 ug / kgBB secara intraperitoneal. Setelah 7 hari (pada waktu tikus pertama kali membuka matanya) mata diamati secara makroskopis pada semua kelompok. Kemudian tikus dikorbankan, dan mata diambil untuk pembuatan preparat histopatologi lensanya. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa herba pegagan (*Centela asiatica*) memiliki efek protektif untuk mencegah terjadinya katarak pada tikus yang diinduksi sodium selenit. Di antara dosis yang digunakan pada penelitian ini yaitu dosis 100 mg/kg BB.

200 mg/kgBB dan 400 mg/kg BB, dosis yang menunjukkan kejadian katarak paling kecil adalah dosis 200 mg/kg BB

Kata kunci : , *Centela asiatica*, sodium selenite, histopatologi, lensa

Abstract

Cataract is one of the eye pathology that can cause blindness. Oxidative stress has been identified as an initiating factor of cataract. The objective research was to study the protective effect of ethanol extract Centela asiatica toward cataract formation on Wistar rat induced by sodium selenite. Cataract was induced in 9 days old Wistar rat, which 5 groups of 7 each. Group I got injection aquadest and the test groups got injection CMC-na (group II), vitamin E dose 378 IU/kg bw (group III), ethanol extract Gotu cola herb dose 100 mg/kg bw (group IV), and 200 mg/kg bw (group V), 400 mg/kgbw, subcutaneously, respectively, for 3 days. After 4 hours, all rats got injection a single dose 50 ug/kg of BW sodium selenite intraperitoneally. Then eyes were observed in all groups on postnatal day 16, when the eyes of the rat first opened. Then percentage of cataract incidence were calculated. Finally rats were executed, and eyes were taken for lens histopathological analyses with hematoxiline eosin staining. Based on macroscopic and microscopic analyses it can be concluded that ethano extract of Centella asiatica had protective effect toward cataract formation on Wistar rat induced by sodium selenite. The least cataract incidence was showed at dose 200 mg/kg bw.

Keyword : , *Centela asiatica*, sodium selenite, histopathologic, lens

PENDAHULUAN

Katarak adalah penyebab utama kebutaan di dunia dan hingga saat ini belum ada strategi untuk menekan angka kejadian penyakit ini secara signifikan (McCarty and Taylor, 2002). Beberapa faktor resiko diidentifikasi sebagai penyebab katarak pada manusia seperti penuaan, diabetes, diare, kekurangan gizi, kemiskinan, sinar matahari, hipertensi, merokok, dan gagal ginjal (Rajesh *et al.*, 2009). Angka kejadian katarak meningkat seiring dengan bertambahnya usia seseorang, katarak yang terjadi pada usia lanjut disebut katarak senilitas. Meskipun katarak adalah penyakit multifaktorial, stres oksidatif diidentifikasi sebagai faktor utama pemicu terjadinya katarak (Zetterstrom *et al.*, 2005).

Hasil penelitian ilmiah menunjukkan bahwa tanaman, buah-buahan, sayuran, dan biji-bijian adalah sumber antioksidan yang baik dan dapat menekan reaksi berantai radikal bebas dalam tubuh (Basile *et al.*, 2005). Salah satu tanaman herbal yang mempunyai efek sebagai antioksidan yang kuat adalah pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban). Pegagan mengandung asiatikosida yang memiliki potensi sebagai antioksidan eksogen yang dapat dijadikan sebagai suplai antioksidan sehingga dapat mencegah stress oksidatif. Dapat dirumuskan suatu permasalahan apakah pemberian pegagan dapat mencegah pembentukan katarak pada model hewan tikus yang diinduksi sodium selenit. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dan membuktikan manfaat ekstrak etanol daun pegagan untuk mencegah terjadinya katarak terhadap hewan uji berupa

tikus putih Wistar berumur 9 hari dan diharapkan penelitian ini dapat meningkatkan pemanfaatan tanaman tersebut di masyarakat, terutama pemanfaatannya sebagai pencegah katarak senilitas.

METODE PENELITIAN

Bahan

Herba pegagan, sodium selenit (Na_2SeO_3), aquabides (produksi Otsuka, Jepang), CMC Na 1% (pensuspensi ekstrak), etanol 70%, formalin, alkohol 70%, dan NaCl Fisiologis.

Alat :

Alat yang digunakan adalah timbangan, mikropipet, jarum suntik volume 1ml, seperangkat alat bedah, dan seperangkat alat-alat gelas, mikroskop, kamera.

Jalannya penelitian

1. Penentuan dosis Sodium Selenit

Berdasarkan penelitian pendahuluan sodium selenit dosis 25 $\mu\text{mol}/\text{KgBB}$ dapat menimbulkan kejadian katarak 100% .

$$n = \frac{\text{Bobot}(g)}{\text{BM Sodium Selenite}}$$

$$25 = \frac{\text{Bobot}}{172,938}$$

$$\text{bobot} = 4,32345 \times 10^{-3} \text{ gram}$$

Sodium Selenit diberikan yaitu $4,32345 \times 10^{-3} \text{ gram}/\text{KgBB}$. Konsentrasi larutan yang dibuat adalah $0,5 \text{ mg}/\text{KgBB}$ dengan melarutkan 25 mg dalam

aquabides sampai 50 ml. Volume maksimal pada tikus 9 hari 0.50ml.

2. Ekstraksi pegagan

Pada tahap ekstraksi, sebanyak 250 gram herba pegagan kering ditambah dengan 1,25 liter etanol 70% diaduk dengan menggunakan stirrer selama 1 jam. Kemudian dimaserasi selama 24 jam. Diulangi 3 kali. Campuran disaring hingga didapat maserat kemudian diuapkan di atas penangas air hingga didapatkan ekstrak kental.

3. Penentuan konsentrasi ekstrak

Dosis ekstrak 100 mg/kg BB =

$$\frac{100 \text{ mg / kgBB} \times 0.015 \text{ kg}}{0,1 \text{ ml}} = 15 \text{ mg/ml}$$

Dosis ekstrak 200 mg/kg BB =

$$\frac{200 \text{ mg / kgBB} \times 0.015 \text{ kg}}{0,1 \text{ ml}} = 30 \text{ mg/ml}$$

Dosis ekstrak 400 mg/kg BB =

$$\frac{400 \text{ mg / kgBB} \times 0.015 \text{ kg}}{0,1 \text{ ml}} = 60 \text{ mg/ml}$$

4. Perlakuan hewan uji.

Penelitian ini menggunakan tikus Wistar umur 9 hari yang dikelompokkan menjadi 6 kelompok, masing-masing kelompok 5 ekor. Kelompok pertama (kontrol sehat) disuntik aquabides. Kelompok ke-dua (kontrol sakit) disuntik larutan CMC-Na 1%. Kelompok ke-tiga disuntik ekstrak etanol herba pegagan dosis pegagan 100 mg/kgBB secara. Kelompok ke-empat disuntik ekstrak etanol herba pegagan

dosis 200 mg / kgBB. Kelompok ke-lima disuntik ekstrak etanol herba pegagan dosis 400 mg/kgBB. Pemberian perlakuan setiap hari selama 3 hari secara intraperitoneal. Empat jam kemudian, semua tikus diberi suntikan sodium selenit dosis tunggal 25 ug / kgBB secara intraperitoneal (kecuali kelompok kontrol sehat). Setelah 7 hari (pada waktu tikus pertama kali membuka matanya) mata diamati secara makroskopis pada semua kelompok. Kemudian tikus dikorbankan, dan organ mata diambil untuk pembuatan preparat histopatologik lensanya.

5. Histopatologi lensa

Preparat histopatologik lensa dibuat dengan pewarnaan rutin hematoksilin dan eosin (H&E) sesuai metode standar yang dilakukan di laboratorium Patologi Kedokteran Hewan UGM,

6. Analisis data

Data yang diperoleh adalah data kualitatif dari gambaran histopatologik lensa yang dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol.

18

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian pendahuluan

Penelitian pendahuluan bertujuan untuk mengetahui apakah senyawa sodium selenit (Na_2SeO_3) mampu menginduksi katarak pada tikus Wistar yang berumur 9 hari. Dosis sodium selenit yang digunakan adalah 15 $\mu\text{mol/kgBB}$, 25 $\mu\text{mol/kgBB}$ dan 50

μmol/kgBB. Metode yang digunakan didasarkan pada penelitian Gupta *et al* (2003) dengan beberapa modifikasi. Sodium selenit dibuat dalam bentuk larutan dan diberikan secara intraperitoneal. Pelarut yang digunakan adalah aquabides atau *water for injection* (WFI) karena sodium selenit (Na₂SeO₃) merupakan suatu garam, sehingga mudah larut dalam air.

Pengamatan dilakukan setelah

Pada percobaan ini menggunakan hewan uji tikus berumur 9 hari. Pemberian obat yang paling memungkinkan pada tikus yang berumur 9 hari adalah intraperitoneal, subkutan, dan intramuscular. Pemberian sodium selenit dan ekstrak pada penelitian ini dilakukan secara intraperitoneal. Pemberian secara intraperitoneal mempunyai resiko terdapatnya infeksi yang cukup besar, apalagi pada penelitian ini hewan uji yang digunakan adalah tikus umur 9 hari. Oleh

Tabel I. Hasil pengamatan makroskopis lensa tikus pada uji pendahuluan untuk mengetahui dosis sodium selenit yang dapat menginduksi terjadinya katarak

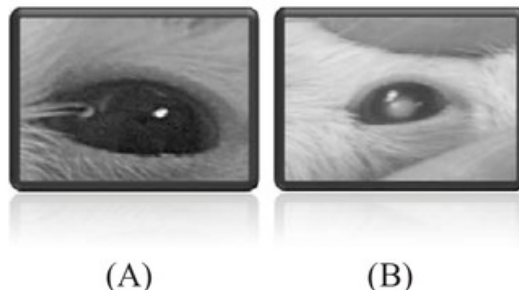
No	Dosis 15 μ mol/kg BB		Dosis 25 μ mol/kg BB		Dosis 50 μ mol/kg BB	
	Kanan	kiri	Kanan	kiri	Kanan	kiri
1.	-	-	katarak	katarak	mati	mati
2.	-	Katarak	katarak	katarak	mati	mati
3.	-	-	katarak	katarak	mati	mati

tikus berumur 16 hari karena pada waktu itu tikus mulai membuka matanya. Secara makroskopik pembentukan katarak pada penelitian pendahuluan adalah 100% untuk dosis 25 μmol/kgBB sehingga berdasarkan hasil tersebut, maka dosis sodium selenit yang digunakan adalah 25 μmol/kgBB yang diberikan secara intraperitoneal.

karena itu penyuntikan ke dalam rongga perut harus hati-hati, tidak masuk ke dalam usus atau organ lainnya.

HASIL PENELITIAN

Hasil penelitian diamati secara makroskopik dan mikroskopik. Pengamatan mikroskopik hasilnya untuk menunjang dan lebih memperjelas peng-

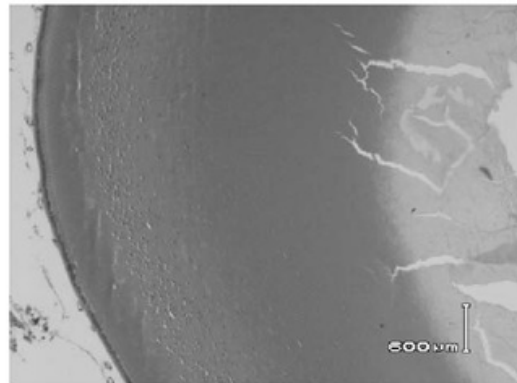


Gambar 1. Pengamatan secara makroskopik mata yang menunjukkan lensa normal (A) dan yang menunjukkan katarak (B)

amatan secara makroskopik. Hasil pemeriksaan secara makroskopik ditunjukkan pada Tabel 1 dan Gambar 1.

Pengamatan pembentukan katarak juga dilakukan dengan pembuatan preparat histopatologik lensa untuk mengetahui abnormalitas sel-sel lensa

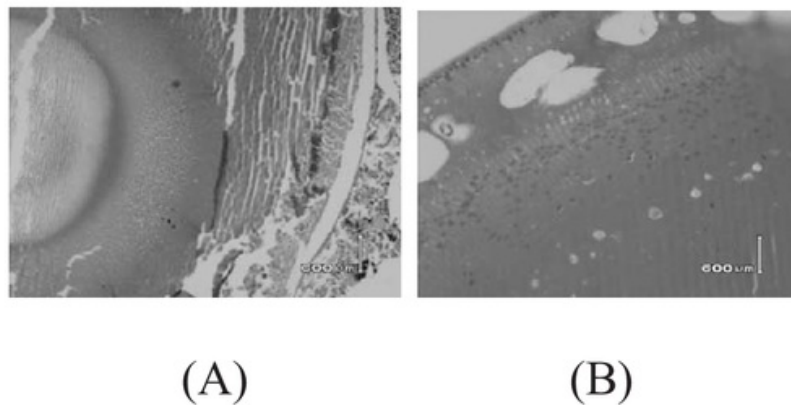
Lensa mata merupakan salah satu jaringan yang dapat mengalami stres oksidatif dan kerusakan pada lensa mata bersifat *irreversible*. Modifikasi kimia komponen penyusun lensa yang di-



Gambar 2. Gambaran histopatologik lensa normal, pengecatan hematoksinilin eosin, perbesaran 200 x

Tabel II. Hasil pengamatan makroskopik lensa pada semua kelompok perlakuan

Kelompok	No. Tikus.	Mata kanan	Mata kiri	% kejadian katarak
Kel. I (CMC Na 1%)	1.	normal	normal	0%
	5.	normal	normal	
	3.	normal	normal	
	4.	normal	normal	
	5.	normal	normal	
Kel. II (Sod. selenit 25 µmol/kgBB)	1.	katarak	katarak	100%
	2.	katarak	katarak	
	3.	katarak	katarak	
	4.	katarak	katarak	
	5.	katarak	katarak	
Vitamin E 378 IU/kg BB	1.	normal	normal	0%
	5.	normal	normal	
	3.	normal	normal	
	4.	normal	normal	
	5.	normal	normal	
Kel. III (Ekstrak etanol herb. peg dosis 100 mg/kgBB)	1.	katarak	katarak	80%
	2.	katarak	katarak	
	3.	normal	normal	
	4.	katarak	katarak	
	5.	katarak	katarak	
Kel. IV (Ekstrak etanol herb. 14. dosis 200 mg/kg BB)	1.	normal	normal	60%
	2.	normal	normal	
	3.	katarak	katarak	
	4.	katarak	katarak	
	5.	katarak	katarak	
Kel. V Ekstrak etanol herb. 14. dosis 400 mg/kg BB	1.	katarak	katarak	100%
	2.	katarak	katarak	
	3.	katarak	katarak	
	4.	katarak	katarak	
	5.	katarak	katarak	



Gambar 3. Gambaran histopatologik lensa yang mengalami katarak, terjadi deproteinasi lensa (A) dan vakuolisasi lensa (B), pengecatan hematoksilin eosin, perbesaran 200x.

perantara agen oksidatif dipercaya sebagai penyebab pembentukan katarak karena adanya gangguan homeostatis elektrolit, agregasi protein, dan hilangnya fungsi enzimatis mata (Shanbu *et al.*, 1984).

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa sodium selenit dapat menginduksi terjadinya katarak. Menurut Gupta *et al* (2003) pemberian dosis tunggal selenit yang diberikan pada hewan tikus umur muda dapat menyebabkan kataraktogenesis yang mirip secara morfologi dan biokimia pada katarak senilitas yang umumnya terjadi pada orang tua. Model hewan katarak dengan induksi menggunakan sodium selenit dikatakan cukup *reproducible* dan sering digunakan untuk mengevaluasi potensi antikatarak dengan menggunakan agen-agen yang berbeda. Sodium selenit dapat menyebabkan kerusakan pertahanan oksidatif dan merusak membran sel sehingga memicu pembentukan katarak. Oksidasi membran epitel dan pembentukan agregat protein yang tidak larut merupakan awal terjadinya kekeruhan pada lensa.



Gambar 6. Kemungkinan reaksi terbentuknya radikal bebas dari sodium selenit. (Selim *et al.*, 2001).

Radikal bebas superoksida dan hidroksil menyebabkan kerusakan terhadap lipid dan protein membran sel yang tersimpan pada permukaan lensa, menyebabkan kekeruhan pada lensa, penurunan kadar plasma askorbat, β karoten, dan peningkatan pembentukan kejadian katarak. Oleh karena itu diperlukan senyawa antioksidan untuk mencegahnya.

Kelompok tikus yang mendapatkan vitamin E dosis 378 IU/kg BB menunjukkan semua tikus secara makroskopik tidak mengalami katarak. Dosis pemberian vitamin E dalam penelitian ini didasarkan pada penelitian sebelumnya (Azie, 2008) yang menunjukkan bahwa pemberian vitamin E dosis 378 IU/kg BB mampu menghambat pembentukan katarak yang diinduksi sodium selenit. Vitamin E

merupakan inhibitor radikal bebas sebagai perangkap radikal bebas. Kerja yang lazim suatu inhibitor radikal bebas ialah bereaksi dengan radikal bebas reaktif membentuk radikal bebas tidak reaktif dan relatif stabil. Suatu senyawa dengan gugus -OH yang terikat pada karbon cincin aromatik seperti vitamin E atau tokoferol (TocOH), merupakan antioksidan yang efektif. Produk radikal bebas senyawa-senyawa ini terstabilkan secara resonansi dan karena itu tidak reaktif dibandingkan dengan kebanyakan radikal bebas lain (Asbell *et al.*, 2005). Adanya aktifitas antioksidan inilah sehingga dapat mencegah oksidasi membran epitel dan pembentukan agregat protein yang tidak larut dan mencegah pembentukan katarak.

Berdasarkan hasil pengamatan makroskopis pada tikus percobaan menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol herba pegagan pada dosis 200 mg/kg BB menunjukkan kejadian katarak yang paling kecil dibandingkan dengan dosis lain. Pegagan mengandung zat aktif yaitu asiaticosida, *madedasoside* (5,30 dan *asiatic acid* (Zainol, *et al.*, 2008). *Asiaticosida* merupakan senyawa yang penting karena memiliki aktifitas antioksidan, yang berperan dalam berbagai aktivitas pencegahan dan penyembuhan penyakit (Satake *et al.*, 2007). Senyawa asiaticosida berperan mengikat oksidan bebas dan menghambat stress oksidatif (Hawse *et al.*, 2003). Adanya aktifitas antioksidan inilah yang kemungkinan akan mencegah oksidasi lensa sehingga mencegah terjadinya kekeruhan pada lensa (katarak). Dalam penelitian pemberian ekstrak dengan dosis yang lebih tinggi ternyata tidak meningkatkan

kemampuannya untuk mencegah terjadinya katarak. Hal ini dapat disebabkan adanya kandungan senyawa lain dalam ekstrak yang kemungkinan dengan bertambahnya dosis akan mengurangi aktifitas antikatarak dari ekstrak herba pegagan.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Berdasarkan hasil makroskopik menunjukkan bahwa ekstrak etanol herba pegagan (*Centella asiatica*) mempunyai efek protektif terhadap pembentukan katarak yang diinduksi oleh sodium selenit pada tikus Wistar.
2. Diantara dosis yang digunakan pada penelitian ini yaitu dosis 100 mg/kg BB, 200 mg/kgBB dan 400 mg/kg BB, dosis yang menunjukkan kejadian katarak paling kecil adalah dosis 200 mg/kg BB

Saran

Untuk penelitian selanjutnya menggunakan dosis ekstrak etanol herba pegagan dengan dosis diantara dosis 100 mg/kg bb dan 200 mg/kg BB.

DAFTAR PUSTAKA

- Aji B.A., 2008, Efek Protektif Vitamin E Terhadap Pembentukan Katarak yang Diinduksi oleh Sodium Selenite pada Tikus Wistar , Skripsi, Fak. Farmasi, UAD
- Asbell, P. A. I. Dualan, J. Mindel, D. Brocks, M. Ahmad, S.Epstein. 2005. Age-related cataracts. Lancet. 365,599-609.

- 15 Basille, A., Ferrara, L., Del Pozzo, M., Mele, G., Sorbo, S., Bassi, P., Montessano, D., 2005. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullina cuppana* Mart. *J. Ethnopharmacol.* 102, 32-36.
- Hawse, John R., James F. Hejtmancik, Qingling Huang, Nancy L. Sgeets, Douglas A. Hosack, Ricard A. Lempicki, Joseph Horwitz, and Marc Kantorow. 2003. Identification and functional clustering of global gene expression differences between human age-related cataract and clear lenses. *New Jarsey.* 515:537-9.
- 2 Gupta, S.K., Trivedi, D., Srivastava, S., Joshi, S., Halder, N., and Verma, S.D., 2003. Lycopene attenuates oxidative stress induced experimental cataract development an in vitro and in vivo study. Basic Naturally Investigation. University of Maryland. Collage Park. Maryland. USA.
- 24 McCarty CA, Taylor HR. 2002, A review of the epidemiologic evidence linking ultraviolet radiation and cataracts. *Dev Ophthalmol.*;35:21-31.
- 26 Pittella, Frederico Rafael C. Dutra, Dalton D. Junior, Miriam T. P. Lopes and Nadia R. Barbosa. 2009. Antioxidant and cytotoxic activities of *Centella asiatica* (L.) Urban. Departamento de Alimentos Toxicologia e Faculdade de Farmácia e Bioquímica, Universidade Federal de Juiz de Fora, Martelos, Brasil. 10, 3713-3721.
- Rajesh Sinha, Chandrashekhar Kumar, Jeewan S Titiyal, 2009, Etiopathogenesis of cataract: Journal review, R. P. Centre for Ophthalmic Sciences, All India Institute of Medical Sciences, Ansari Nagar, New Delhi, India, Vol. 57 :3, 245-249.
- 12 Satake T, Kamiya K, An Y, Oishi T and Yamamoto J. 2007. The anti-thrombotic active constituents from *Centella asiatica*. *Biol. Pharm. Bull.* 30(5) 935-940.
- 25 Selim Doganay, Yusuf Turkoz, Cem Evereklioglu, Hamdi Er, Mehmet Bozaran, Elif Ozerol, 2001, Use of caffeic acid phenethyl ester to prevent sodium-selenite-induced cataract in rat eyes. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, Vol., 28, Issue 8 , Pages 1457-1462.
- 23 Shambhu D. Varma, Diwan Chand, Yog R. Sharma, John F. Kuck and Richard D. Richards,, 1984, Oxidative stress on lens and cataract formation: role of light and oxygen, *Current Eye Research*, 1984, Vol. 3, No. 1 , Pages 35-58
- 16 Zainol, N.A.S.C. Voo, M.R. Sarmidi, R.A. Aziz. 2008. Profiling of *Centella asiatica* (L.) Urban extract. *Faculty Of Chemical and Natural Resources Engineering, Chemical Engineering Pilot Plant, Universiti Teknologi Malaysia,*

16

Skudai, Johor Darul Takzim,
Malaysia. 12, 322-327.

Zetterstrom, C.A. Lundvall, M.
Kugelberg. 2005. Cataracts in
children, J. Cataract Refract. Surg.
31, 824-840.

Efek Protektif Ekstrak Etanol Herba Pegagan (*Centella Asiatica* (L.) Urban) Terhadap Pembentukan Katarak Tikus Wistar Yang Diinduksi Sodium Selenit

ORIGINALITY REPORT

15%

SIMILARITY INDEX

PRIMARY SOURCES

1	documents.mx Internet	36 words — 1%
2	atrium.lib.uoguelph.ca Internet	31 words — 1%
3	www.digilib.stikes-bth.ac.id Internet	31 words — 1%
4	repositori.usu.ac.id Internet	28 words — 1%
5	www.ul.com Internet	26 words — 1%
6	www.scribd.com Internet	25 words — 1%
7	dokumen.tips Internet	24 words — 1%
8	docplayer.info Internet	23 words — 1%
9	publikasiilmiah.ums.ac.id Internet	22 words — 1%
10	pt.scribd.com Internet	20 words — 1%
11	eprints.ums.ac.id Internet	17 words — 1%

12	www.bulletinveteriner.com Internet	16 words — 1%
13	www.ncbi.nlm.nih.gov Internet	16 words — 1%
14	jurnal.batan.go.id Internet	16 words — 1%
15	repositorio.ufjf.br Internet	14 words — < 1%
16	pkukmweb.ukm.my Internet	12 words — < 1%
17	www.affaveti.org Internet	12 words — < 1%
18	repository.unpas.ac.id Internet	10 words — < 1%
19	oktarinalusy.wordpress.com Internet	9 words — < 1%
20	dspace.udel.edu Internet	8 words — < 1%
21	nrmnews.com Internet	8 words — < 1%
22	repository.uin-malang.ac.id Internet	8 words — < 1%
23	Joe M. McCord, Eugene D. Day. "Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex", FEBS Letters, 1978 Crossref	6 words — < 1%
24	www.intechopen.com Internet	6 words — < 1%
25	www.ascrs.org Internet	5 words — < 1%

EXCLUDE QUOTES ON
EXCLUDE BIBLIOGRAPHY ON

EXCLUDE MATCHES OFF