

Turnitin_UJI_KETAHANAN_PENY
AKIT_KARAT_PUTIH-
compressed-2.pdf
by

Submission date: 06-Nov-2021 02:58PM (UTC+0700)

Submission ID: 1694698020

File name: Turnitin_UJI_KETAHANAN_PENYAKIT_KARAT_PUTIH-compressed-2.pdf (149.3K)

Word count: 2730

Character count: 17348

**UJI KETAHANAN PENYAKIT KARAT PUTIH PADA TANAMAN KRISAN
TRANSGENIK PUTATIF SECARA IN VITRO**
(*ESTABLISHMENT OF RESISTANCE OF WHITE RUST DISEASE IN PUTATIVE
TRANSGENIC IN-VITRO*)

Rinaldi Sjahril¹, Irma Jamaluddin^{2*}, Asman³, Marhamah Nadir⁴

¹ Laboratorium Biosains dan Bioteknologi Reproduksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Unhas

² Mahasiswa Program Magister Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Unhas

³ Laboratorium Hama dan Penyakit Tanaman, Fakultas Pertanian, Unhas

⁴ Laboratorium Kimia Pakan, Fakultas Peternakan, Unhas

* Korespondensi: No. telp/HP: 085255741599, Email: jamaluddinirma@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menguji ketahanan penyakit karat putih (*Puccinia horiana*) pada tanaman krisan transgenik putatif hasil dari percobaan transformasi gen defensin wasabi (pEKH-WD) ke dalam genom tanaman krisan varietas Limeron untuk menghasilkan tanaman krisan resisten penyakit karat putih secara in vitro. Percobaan ini menggunakan planlet hasil transformasi dengan menginfeksi sorus *Puccinia horiana*. Percobaan dilakukan dengan perlakuan dua metode inokulasi pada tanaman krisan transgenik putatif dan non transgenik sebagai kontrol. Perlakuan yang diujikan berupa U1K0: Pengujian 1 pada tanaman non-transgenik, U1K1: Pengujian 1 pada tanaman transgenik, U2K0: Pengujian 2 pada tanaman non-transgenik, dan U2K1: Pengujian 2 pada tanaman transgenik. Pengujian metode pertama (U1) dilakukan dengan menginokulasi langsung secara aseptik dalam botol kultur dan pengujian metode kedua (U2) dengan cara menempelkan daun terinfeksi pada tutup botol kultur. Setiap perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Observasi tanaman toleran atau tidak dilakukan dengan mengamati planlet yg terinfeksi kemudian mati atau planlet toleran bila tetap hidup. Pengamatan dilakukan dengan parameter pengamatan pada metode terbaik dalam pengujian ketahanan penyakit secara in vitro dalam botol kultur terhadap tanaman transgenik putatif dan persentase tingkat ketahanan tanaman terhadap serangan penyakit karat putih. Hasil yang diperoleh tingkat serangan tertinggi pada metode 1 tanaman non-transgenik (U1K0) sebesar 80% dengan tingkat resistensi sebesar 20%. Sedangkan pada metode uji pertama tanaman transgenik tingkat serangan sebesar 38% dengan tingkat resistensi sebesar 62%. Pada metode kedua tidak terjadi serangan baik pada tanaman non-transgenik (0%) maupun tanaman transgenik (0%). Uji ketahanan penyakit secara in vitro menghasilkan 62% tanaman resisten dengan metode inokulasi langsung.

ABSTRACT

*This study aimed to examine the resistance of white rust disease (*Puccinia horiana*) to putative transgenic chrysanthemum plants as a result of experiments on transformation of wasabi defensin (PEKH-WD) genes into the genome of chrysanthemum plants of Limeron variety to produce white rust resistant chrysanthemum plants in vitro. This experiment uses a transformed plantlet by infecting *Puccinia horiana* sorus. The experiment was carried out by treating two inoculation methods on putative and non-transgenic chrysanthemum plants as a control. The treatments tested were U1K0: Method 1 in non-transgenic plants, U1K1: Method 1 in transgenic plants, U2K0: Method 2 in non-transgenic plants, and U2K1: Method 2 in transgenic plants. The first method (U1) is done by aseptically directly inoculating in a culture bottle and the second method (U2) by attaching infected leaves to the culture bottle cap. Each treatment was repeated 3 times. Observation of tolerant plants or not carried out by observing infected plantlets and then die or tolerant plantlets if still alive. Observations were made with*

observational parameters on the best method of in vitro disease resistance testing in culture bottles against putative transgenic plants and percentage of the level of plant resistance to white rust attack. The highest yield of an attack on method 1 of non-transgenic (U1K0) method was 80% with a resistance level of 20%. Whereas in the first method of transgenic plants the attack rate was 38% with a resistance level of 62%. In the second method, there were no attacks either on non-transgenic plants (0%) or transgenic plants (0%). In vitro disease resistance test resulted in 62% of resistant plants by direct inoculation method.

Kata kunci: *krisan, transgenik putatif, Puccinia horiana, in vitro, ketahanan penyakit.*

Keywords: *chrysanthemum, putative transgenic, Puccinia horiana, in vitro, disease resistance.*

PENDAHULUAN

Pengembangan tanam hortikultura/florikultura di Indonesia saat ini semakin baik dan meningkat khususnya pada tanaman hias. Salah satu tanaman hias yang penting di Indonesia adalah tanaman Krisan. Krisan (*Dendrathera grandifolia* syn. *Chrysanthemum morifolium*) merupakan salah satu komoditas ekspor florikultura terbesar di Indonesia. Permintaan bunga potong krisan terus meningkat seiring dengan peningkatan pendapatan dan kesejahteraan masyarakat. Produksi krisan di Indonesia selama tiga tahun terakhir (2015-2017) terus mengalami peningkatan dari produksi 442.998.194 tangkai (2015) meningkat menjadi 480.685.420 tangkai untuk tahun 2017 dengan luas panen 11.635.498 Ha.

Ekspor krisan dari Indonesia ke beberapa negara dalam bentuk bunga potong segar umumnya digunakan sebagai bahan dekorasi ruangan. Krisan diminati karena keindahan bunga dan daya tahan yang lama sebagai bunga potong. Meskipun memiliki potensi yang besar sebagai penghasil devisa negara, pengembangan krisan menghadapi masalah penyakit karat putih (*Puccinia horiana* P. Henn). Tanaman yang diserang penyakit karat putih akan menurunkan kualitas daun dan bunga sehingga sulit dipasarkan. Tanaman yang bebas dari hama dan penyakit juga telah menjadi syarat utama untuk memenuhi pasar ekspor global (Anonim, 2017). Suhardi (2009) menyatakan kehilangan hasil akibat karat putih dapat mencapai 30%. Pada tanaman rentan, kerusakan tanaman mencapai 100% sehingga tanaman tidak menghasilkan bunga karena cendawan telah menginfeksi sejak tanaman berumur 30 hari setelah tanam (Hanudin et al. 2004).

Pengendalian penyakit karat putih umumnya dilakukan dengan fungisida, namun biasanya tidak tepat sasaran, sehingga penyakit tidak dapat dikendalikan. Selain itu, akan menimbulkan dampak negatif terhadap lingkungan dengan biaya produksi bertambah. Konsumen produk-produk pertanian saat ini mulai selektif terhadap produksi pertanian yang mereka beli sehingga pasar global juga cenderung menolak produk pertanian dengan residu pestisida. Oleh karena itu, diperlukan alternatif pengendalian penyakit karat putih yang lebih ramah lingkungan dan lebih ekonomis dalam jangka panjang.

Salah satu alternatif yang potensial yaitu dengan mengembangkan tanaman resisten. Pengembangan tanaman resisten dapat dilakukan melalui pemuliaan tanaman, namun pada tanaman krisan, terbatasnya plasma nutfah yang tahan terhadap penyakit ini menjadi kendala utama. Hal ini dapat disiasati dengan memanfaatkan bioteknologi, khususnya bidang rekayasa genetik.

Teknologi rekayasa genetik dan transformasi genetik memungkinkan penyisipan gen dari organisme lain ke dalam genom tanaman. Gen resisten penyakit yang disisipkan misalnya dapat mengkode protein dengan aktivitas anti mikrobal yang memungkinkan tanaman melindungi

diri dari serangan fungi ataupun bakteri penyebab penyakit. Penyisipan gen ke dalam genom tanaman dapat menghasilkan tanaman yang bebas dari penyakit tersebut.

Penyakit karat putih pada krisan disebabkan oleh fungi *Puccinia horiana*. Fungi ini bersifat parasit obligat atau hanya dapat hidup sebagai parasit pada tanaman hidup. Penyakit ini pertama kali dilaporkan ditemukan di Asia Timur dan diidentifikasi oleh Puccinia Horiana Henning pada 1895. Telah dilaporkan pertama kali masuk ke Indonesia pada sekitar tahun 1990 melalui bibit krisan impor (Bonde et al. 1995).

Tingkat kehilangan hasil akibat serangan penyakit karat putih cukup tinggi. Suhardi (2009) melaporkan kehilangan hasil diperkirakan mencapai hingga 30% akibat penurunan nilai jual dan penundaan masa panen. Hanudin dan Budi Marwoto (2012) juga melaporkan kehilangan hasil akibat patogen *Puccinia horiana* pada tanaman rentan mencapai 100%, karena cendawan cepat menyebar dari satu tanaman ke tanaman lain dengan menggunakan basidiospora dan teliospora.

Bibit patogen ini sangat mudah menyebar. Vektor penyebarannya antara lain melalui bibit yang telah terinfeksi, angin, air, perlakuan pemeliharaan, melalui para pekerja, dan peralatan pertanian yang telah digunakan pada tanaman yang terinfeksi. Menurut Suhardi (2009), kurang lebih 28% bibit yang diproduksi oleh petani telah terinfeksi penyakit ini. Penyakit ini diduga telah menyebar luas ke seluruh sentra produksi krisan di Indonesia. Penggunaan benih yang bebas patogen merupakan langkah strategis untuk mengurangi sumber inokulum.

Ketersediaan varietas krisan tahan terhadap penyakit (karat putih) masih sangat terbatas. Meskipun program hibridisasi krisan untuk memperoleh varietas unggul telah dilakukan sejak tahun 1995, namun hasilnya belum menggembirakan. Penelitian yang dilakukan tahun 1999-2000 menunjukkan bahwa dari 32 klon krisan yang diuji resistensinya terhadap penyakit karat, tidak satu klonpun yang menunjukkan resisten (Marwoto, 2000). Penelitian yang dilakukan oleh Rahardjo dan Suhardi (2009) yang menyeleksi 13 klon untuk mencari klon krisan yang resisten juga hanya memperoleh satu klon yang agak tahan.

Upaya mengintroduksi sifat tahan penyakit ke dalam tanaman sangat penting dilakukan khususnya dalam mengantisipasi berlakunya eco labeling di pasar global. Oleh karena itu, penggunaan teknologi rekayasa genetika melalui transformasi gen merupakan salah satu alternatif yang potensial untuk menjawab masalah penyakit karat putih (*Puccinia horiana*) pada tanaman krisan.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bio-Sains dan Bioteknologi Reproduksi Tanaman, Departemen Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Hasanuddin, Makassar. Penelitian berlangsung dari September 2018 sampai Desember 2018.

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah tanaman krisan transgenik putatif hasil percobaan pertama, planlet krisan non transgenik sebagai kontrol, tanaman krisan berpenyakit yang didatangkan dari petani krisan di Malino, plastik transparan, tali rafia, mata pisau skalpel, kertas saring, isolasi/plaster (3M Micropore™), aquades steril, dan kertas tisu steril.

Alat-alat yang digunakan adalah pisau, cutter, gunting, skalpel, Laminar Air Flow Cabinet (LAFC) (Esco® IEC 61010-1), cawan Petri dan alat tulis menulis.

Metode Penelitian

Percobaan ini merupakan pengujian ketahanan atau toleransi penyakit karat putih pada planlet transgenik putatif yang dilakukan secara *in vitro*. Planlet yang digunakan dalam percobaan ini hanya dari sumber eksplan tunas adventif karena jumlah tunas yang tumbuh hasil transformasi pada percobaan pertama dari sumber eksplan daun dan internoda sangat sedikit sehingga tidak cukup untuk dilakukan pengujian ini. Planlet diinfeksi menggunakan sorus *Puccinia horiana*. Percobaan ini dilakukan dengan perlakuan dua metode inokulasi pada tanaman krisan transgenik putatif dan non transgenik sebagai kontrol. Perlakuan yang diujikan berupa:

- U₁K₀ : Metode pengujian 1 pada tanaman krisan non transgenik
- U₁K₁ : Metode pengujian 1 pada tanaman krisan transgenik
- U₂K₀ : Metode pengujian 2 pada tanaman krisan non transgenik
- U₂K₁ : Metode pengujian 2 pada tanaman krisan transgenik

Metode pengujian pertama (U₁) dilakukan dengan menginokulasi langsung secara aseptik dalam botol kultur sementara metode pengujian kedua (U₂) dengan cara menempelkan daun terinfeksi pada tutup botol kultur. Setiap perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Observasi tanaman toleran atau tidak dilakukan dengan mengamati planlet yg terinfeksi kemudian mati atau planlet toleran bila tetap hidup.

Pelaksanaan Penelitian

Bahan tanaman yang digunakan berasal dari klon krisan transgenik hasil transformasi dari percobaan pertama dan krisan non-transgenik sebagai kontrol. Secara *in vitro* hasil isolat-isolat penyakit karat putih diinokulasikan ke tanaman uji dengan metode I dan II secara *in vitro*. Pengujian ketahanan penyakit karat putih terhadap krisan transgenik putatif dilakukan secara aseptik di laboratorium dalam *laminar air flow cabinet*. Pengambilan penyakit di lapangan dilakukan dengan memilih tanaman krisan yang memperlihatkan banyak teliospora (sorus) yang diperoleh dari kelompok tani krisan di Malino, Kabupaten Gowa. Karat putih (*Puccinia horiana*) bersifat parasit obligat sebagai organisme hidup yang hanya dapat hidup atau bertahan pada tumbuhan hidup sebagai inangnya sehingga sulit membuat biakan murni yang dapat ditumbuhkan dalam media buatan.

Ada dua metode uji yang digunakan dalam percobaan ini yaitu Metode uji pertama dengan inokulasi langsung. Teliospora dari daun terinfeksi diangkat menggunakan scalpel steril kemudian dipindahkan dan ditorehkan langsung ke daun klon krisan transgenik putatif dan kontrol. Metode uji kedua adalah metode dari Pedley (2009) yaitu dengan menempelkan daun terinfeksi ke tutup botol kultur menggunakan *3M micropore plaster*. Daun terinfeksi dialasi dengan kertas saring yang telah dibasahi dan ditempelkan bersama pada tutup bagian dalam botol untuk menjaga kelembaban. Tanaman yang telah diinfeksi kemudian diinkubasi selama 2-4 minggu. Pengamatan dilakukan terhadap ekspresi gejala penyakit yang muncul dan tingkat serangan pada tanaman uji beberapa hari setelah inokulasi.

Parameter Pengamatan

Pengamatan dilakukan pada akhir percobaan dengan parameter pengamatan sebagai berikut:

1. Metode uji terbaik dalam pengujian ketahanan penyakit secara *in vitro* dalam botol kultur terhadap tanaman transgenik putatif. Indikator menjadi penentu adalah terjadi serangan pada tanaman. Diamati secara visual infeksi sorus penyakit pada tanaman uji dalam botol.
2. Persentase tingkat kerentanan tanaman terhadap serangan penyakit karat putih. Dihitung jumlah tanaman yang terserang.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Ketahanan Penyakit

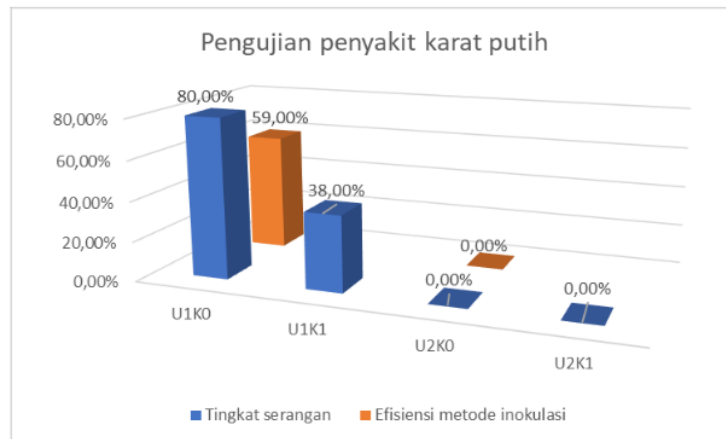
Dari dua metode uji ketahanan penyakit karat putih terhadap planlet krisan transgenik putatif yang dilakukan secara aseptik dalam botol kultur secara in vitro memperlihatkan terjadi serangan pada Metode uji 1 (inokulasi langsung dengan mengoleskan sorus ke tanaman uji). Sementara pada Metode uji 2 (menempelkan daun terinfeksi pada tutup botol) sama sekali tidak terjadi serangan pada tanaman uji dalam botol, sehingga metode pengujian dengan pengolesan langsung (Metode uji 1) lebih efektif digunakan dibandingkan dengan metode penempelan daun terinfeksi pada tutup botol kultur (Metode uji 2). Berdasarkan hasil pengamatan, daun mengandung sorus yang ditempelkan pada tutup botol kultur mengalami kekeringan kemudian mati sebelum menginfeksi tanaman uji yang berada di bawahnya. Sedangkan sorus yang jatuh ke media kultur dalam botol hanya menimbulkan kontaminasi pada media kultur di bawahnya (media padat/agar), tidak menginfeksi tanaman di atasnya. Hal ini disebabkan karena fungi *Puccinia horiana* bersifat parasit obligat yang hanya dapat hidup sebagai parasit pada tanaman hidup. *P. horiana* adalah patogen biotropik obligat yang menginfeksi terutama jaringan baru tanaman yang sedang tumbuh, namun terkadang juga menginfeksi daun yang lebih tua (Firman, 1968).

Jumlah tanaman terinfeksi pada non transgenik untuk uji #1 sebesar 40 tanaman dari 50 total tanaman uji, sedangkan jumlah tanaman terinfeksi pada transgenik sebesar 19 tanaman dari 50 total tanaman uji, sehingga persentase tingkat serangan dengan Metode uji 1 pada planlet non-transgenik sebesar 80%, sedangkan pada planlet transgenik putatif sebesar 38%. Hal ini menandakan sebanyak 62% dari total tanaman krisan transgenik yang diinokulasi resisten terhadap penyakit karat putih, namun untuk membuktikan lebih lanjut apakah gen resisten penyakit karat putih tersebut menurun pada generasi selanjutnya diperlukan uji lapangan di screen house tertutup dan analisis DNA/RNA lanjutan (Southern blot dan Western blot analysis).

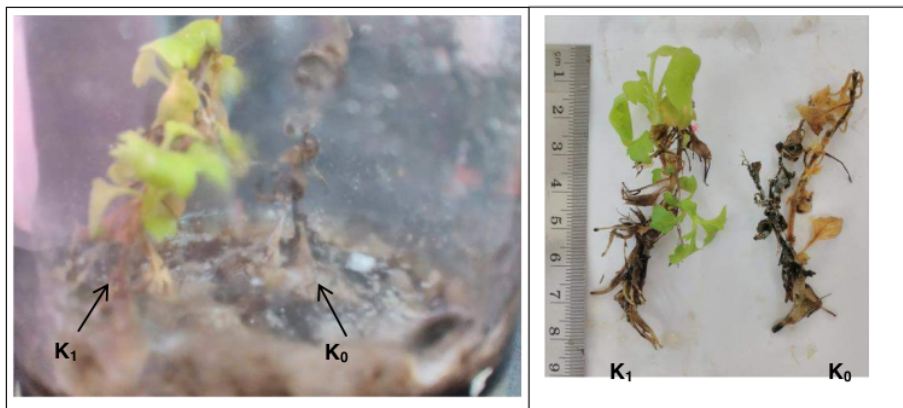
Gambar dan tabel

Grafik pada Gambar 1 menunjukkan hasil metode inokulasi penyakit karat putih pada planlet krisan transgenik putatif yang dilakukan secara aseptik dalam botol kultur. Inokulasi dilakukan dengan dua metode, yang dilakukan dalam kondisi aseptik di laminar. Metode pertama adalah inokulasi langsung dan metode kedua adalah menempelkan daun terinfeksi pada tutup botol. Setelah tiga kali inokulasi diperoleh tingkat serangan tertinggi pada metode uji 1 pada tanaman non-transgenik (U_1K_0) sebesar 80%, sedangkan pada metode uji 1 pada tanaman transgenik tingkat serangan sebesar 38%. Pada metode kedua tidak terjadi serangan baik pada tanaman non-transgenik (0%) maupun tanaman transgenik (0%).

Pengujian resistensi terhadap penyakit dengan menggunakan metode pertama berupa penggosoran sorus secara langsung ke daun tanaman. Pada pengamatan tiga minggu setelah inokulasi sorus yang ditempelkan pada tanaman transgenik mengalami pencoklatan kemudian menghitam dan mati. Sedangkan sorus yang ditempelkan pada tanaman non-transgenik tumbuh dan berwarna putih. Pada pengamatan tiga bulan setelah inokulasi (Gambar 2) menunjukkan tanaman non-transgenik mengalami pembusukan, berwarna coklat dan akhirnya mati sedangkan pada tanaman transgenik putatif tetap tumbuh dan menghiijau.



Gambar 1. Pengujian penyakit secara *in vitro* dengan metode uji 1 (U1): pengolesan sorus langsung ke daun dan metode uji 2 (U2): menempelkan sorus pada tutup botol. Pengamatan tiga minggu setelah inokulasi. K0 = tanaman non-transgenik dan K1 = tanaman transgenik.



Gambar 2. Pengujian penyakit secara *in vitro* dengan metode pengolesan sorus langsung ke daun. Pengamatan 3 bulan setelah inokulasi. K0= krisan non-transgenik membusuk dan mati, K1= krisan transgenik hijau dan tetap hidup.

KESIMPULAN DAN SARAN

Uji ketahanan penyakit secara *in vitro* menghasilkan 38% tingkat kerentanan tanaman krisan transgenik putatif dengan metode inokulasi langsung.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kemenristek Dikti yang telah mendanai penelitian ini melalui Program Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi (PTUPT) dengan nomor kontrak: 1740/UN4.21/PL.00.00/2019 Tanggal 11 April 2019. Serta ucapan terima kasih kepada semua pihak yang telah berpartisipasi dalam penyelesaian penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Anonim. 2017. Sanitary and Phytosanitary (SPS) Measures. <http://karantina.pertanian.go.id/>, diakses pada tanggal 21 April 2019.

- 6 Bonde, M.R., G.L. Peterson, S.A. Rizvi, dan J. L. Smilanick. 1995. Myclobutanil as a curative
13 agent for chrysanthemum white rust. *Plant Diseases* 79(5): 500–505.
- Firman, I.D. dan Martin, P. H. 1968. White rust of chrysanthemums. *Ann. Appl. Biol.* 62: 429-
3 442.
- Hanudin dan B. Marwoto. 2012. Penyakit karat putih pada krisan dan upaya pengendaliannya.
5 *Jurnal Litbang Pertanian* 31(2).
- Hanudin, K., Kardin, dan Suhardi. 2004. Evaluasi Ketahanan Klon-klon Krisan terhadap
4 Penyakit Karat Putih. *J. Hort.* 14 (Ed. Khusus): 430-435.
- Marwoto, B. 2000. Perakitan Varietas Tahan Penyakit Karat pada Krisan dan Hama Tungau
pada Anyelir dan Efisiensi Teknik Budidaya. Balai Penelitian Tanaman Hias, Jakarta
Hlm: 56-712
- Pedley, Kerry F. 2009. PCR-Based Assays for the Detection of *Puccinia horiana* on
7 *Chrysanthemums*. *Plant Disease* 93(12): 1252-1258.
- Rahardjo, I.B. dan Suhardi. 2008. Insidensi dan Intensitas Serangan Penyakit Karat Putih pada
8 Beberapa Klon Krisan. *J. Hort.* 18(3): 312-318.
- Suhardi. 2009. Sumber inokulum, respons varietas, dan efektivitas fungisida terhadap penyakit
karat putih pada tanaman krisan. *Jurnal Hortikultura* 19(2): 207–209.

Turnitin_UJI_KETAHANAN_PENYAKIT_KARAT_PUTIH-compressed-2.pdf

ORIGINALITY REPORT

17%

SIMILARITY INDEX

17%

INTERNET SOURCES

7%

PUBLICATIONS

4%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	tantriat0.blogspot.com Internet Source	2%
2	text-id.123dok.com Internet Source	2%
3	id.123dok.com Internet Source	1%
4	www.scribd.com Internet Source	1%
5	repository.uksw.edu Internet Source	1%
6	core.ac.uk Internet Source	1%
7	Submitted to Universitas Jenderal Soedirman Student Paper	1%
8	ejurnal.bppt.go.id Internet Source	1%
9	Z Arifin, S Sukartono, L E Susilawati, B H Kusumo, I Yasin. "Performance of maize	1%

under two different methods of fertilizer application in semi-arid tropic Dompu Indonesia", Journal of Physics: Conference Series, 2019

Publication

10	anzdoc.com Internet Source	1 %
11	www.unhas.ac.id Internet Source	1 %
12	Submitted to University of New England Student Paper	1 %
13	nysipm.cornell.edu Internet Source	1 %
14	eprints.unram.ac.id Internet Source	1 %
15	play.google.com Internet Source	1 %
16	repository.unri.ac.id Internet Source	<1 %
17	ejournal.litbang.pertanian.go.id Internet Source	<1 %
18	dosenpertanian.com Internet Source	<1 %
19	journal.unhas.ac.id Internet Source	<1 %

20

jurnal.um-palembang.ac.id

Internet Source

<1 %

21

S. Tuhuteru, Meity L Hehanussa, Simon H.T Raharjo. "Pertumbuhan Dan Perkembangan Angrek Dendrobium anosmum Pada Media Kultur In Vitro Dengan Beberapa Konsentrasi Air Kelapa", Agrologia, 2018

Publication

<1 %

22

ejournal3.undip.ac.id

Internet Source

<1 %

23

sulut.litbang.pertanian.go.id

Internet Source

<1 %

Exclude quotes On

Exclude matches < 5 words

Exclude bibliography On