

KONFIRMASI HASIL OSMOTIC FRAGILITY TEST (OFT) BERDASARKAN KADAR HEMOGLOBIN

by Widya Cahya Maggyasari - Budi Santosa

Submission date: 03-Dec-2022 10:36AM (UTC+0700)

Submission ID: 1969864090

File name: document.pdf (602.96K)

Word count: 2782

Character count: 16330

KONFIRMASI HASIL OSMOTIC FRAGILITY TEST (OFT) BERDASARKAN KADAR HEMOGLOBIN

Confirmation Of Osmotic Fragility Test (OFT) Results Based On Hemoglobin Levels

10 Widya Cahya Maggyasari¹, Budi Santosa²
1 Department of Medical Laboratory Technology/Analisis Kesehatan Universitas
7 Muhammadiyah Semarang, Indonesia
2* Department of Medical Laboratory Technology/Clinical Laboratory Science
Universitas Muhammadiyah Semarang, Indonesia

Koresponden : budisantosa@unimus.ac.id/081805867211

ABSTRACT

Erythrocyte fragility is the reaction of the erythrocyte membrane to oppose the osmotic pressure of the surrounding solution. Several influencing factors are haemoglobin levels, erythrocyte shape, erythrocyte lifespan, and lipoprotein content of the erythrocyte membrane. The purpose of the study was to determine the results of the osmotic fragility test (OFT) based on haemoglobin levels. The research method was descriptive with a population of Unimus MLT students. A sample of 20 people and specimens in the form of venous blood was checked for Hb levels using a haematology analyser and OFT levels using a series of test tube dilutions. The results showed that the average OFT levels were 0.37 ± 1.67 and Hb levels were 13.39 ± 0.01 . Complete lysis occurred with OFT level 0.46% at Hb level ≥ 15 g/dl. In conclusion, OFT levels and average Hb levels are still within normal limits, there are 4 Hb levels below normal or mild anemia with normal OFT levels, while Hb levels ≥ 15 g/dl have OFT levels above normal.

Keywords: Erythrocytes, Hb levels, OFT

ABSTRAK

4
Fragilitas eritrosit merupakan reaksi membran eritrosit untuk melawan tekanan osmosis larutan disekitarnya. Beberapa faktor yang mempengaruhi adalah kadar hemoglobin, bentuk eritrosit, umur eritrosit, kandungan lipoprotein dinding eritrosit. Tujuan penelitian untuk mengetahui hasil *osmotic fragility test (OFT)* berdasarkan kadar hemoglobin. Metode penelitian deskriptif dengan populasi mahasiswa analisis kesehatan Unimus. Sampel sebanyak 20 orang dan spesimen berupa darah vena yang diperiksa kadar Hb menggunakan alat *hematology analyzer* dan kadar *OFT* menggunakan seri pengenceran tabung reaksi. Hasil penelitian menunjukkan rerata kadar *OFT* $0,37 \pm 1,67$ dan kadar Hb $13,39 \pm 0,01$. Terjadi lisis sempurna dengan kadar *OFT* 0,46% pada kadar Hb ≥ 15 g/dl. Simpulan kadar *OFT* dan kadar Hb reratanya masih dalam batas normal, ada 4 kadar Hb dibawah normal atau anemia ringan yang memiliki kadar *OFT* normal, sedangkan kadar Hb ≥ 15 g/dl memiliki kadar *OFT* diatas normal.

Kata Kunci: Eritrosit, Hb, OFT

PENDAHULUAN

Salah satu komponen sel darah merah adalah hemoglobin yang berfungsi untuk mengangkut oksigen ke seluruh jaringan tubuh dan karbondioksida kembali dari jaringan tubuh menuju ke paru-paru. (Rismayanthi, 2016)(Agus, 2017). Tinggi rendahnya kadar hemoglobin (Hb) mengindikasikan adanya gangguan kesehatan. Kadar Hb yang rendah mengindikasikan anemia (Cappellini & Motta, 2015)(Goodnough & Schrier, 2014).

Anemia dapat diklasifikasikan menjadi beberapa kelompok, diantaranya adalah anemia hemolitik (Amalia, 2021)(Cappellini & Motta, 2015)(Tvedten, 2022). Anemia hemolitik adalah suatu kondisi adanya penurunan jumlah eritrosit yang disebabkan oleh destruksi yang berlebihan sebelum usia normal eritrositnya, sehingga kadar Hb dan jumlah eritrositnya mengalami penurunan. Penurunan kadar Hb dapat dikelompokkan menjadi 3 yaitu 10,0-10,9 g/dL (anemia ringan), Hb 7,0-9,9 g/dL (anemia sedang), dan Hb <7,0 g/dL (anemia berat). (Barcellini & Fattizzo, 2015)(Phillips & Henderson, 2018)(Brodsky, 2015)(Haley, 2017)

Osmotic Fragility Test (OFT) adalah salah satu pemeriksaan hematologi yang digunakan untuk menilai ketahanan sel darah merah terhadap terjadinya hemolisis pada eritrosit. Prinsip pemeriksaan OFT adalah mengukur reaksi membran eritrosit dalam mempertahankan tekanan osmotik media disekitarnya (Arora et al., 2018). OFT di dalam laboratorium hematologi ditegakkan untuk membantu diagnosis beberapa jenis anemia. Prinsip pemeriksaan OFT adalah menilai kekuatan membrane sel eritrosit menggunakan larutan salin yang diencerkan bertingkat (Gérard et

al., 2017). Batas normal OFT adalah pada konsentrasi 0,32%-0,44%. Apabila sel eritrosit lisis pada konsentrasi diatas 0,44% dan dibawah 0,32% maka menunjukkan gangguan fragilitas membran eritrosit. Kerusakan/destruksi membran eritrosit merupakan suatu kondisi kerapuhan dinding sel eritrosit sehingga *fragilitas* membran eritrosit meningkat, mudah lisis dan komponen hemoglobin keluar bercampur dengan cairan plasma. (Salvagno et al., 2020)(Zhang et al., 2015)

Daya tahan osmotik dipengaruhi oleh beberapa hal diantaranya adalah umur eritrosit, bentuk eritrosit, kadar hemoglobin (Antwi-Baffour et al., 2013). Seberapa jauh perubahan kadar Hb berkaitan dengan meningkatnya *fragilitas* membran eritrosit perlu dikonfirmasi dengan pemeriksaan *Osmotic Fragility Test (OFT)*.

METODE

Desain, tempat, dan waktu penelitian

Pada penelitian ini menggunakan deskriptif dengan populasi mahasiswa D3 Analisis Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang. Sampel yang dipakai sebanyak 20 orang yang diambil dengan teknik *purposive*. Spesimen menggunakan darah vena yang diperiksa kadar Hb nya memakai alat *hematology analyzer* dan OFT diperiksa dengan cara pengenceran berseri menggunakan tabung reaksi (konsentrasi pengenceran 0,5;0,48;0,46;0,44;0,42;0,40;0,38;0,36; 0,34;0,32;0,30; 0,28). Data berupa kadar hemoglobin dan kadar OFT disajikan secara deskriptif dalam bentuk gambar dan tabel.

Tempat penelitian dilakukan di laboratorium Patologi Klinik Universitas Muhammadiyah Semarang. Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan April sampai Juni 2022

Langkah-langkah Penelitian: Persiapan peralatan dan bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi spuit, tourniquet, kapas alkohol, kapas kering, plesterin, fial, tabung reaksi, rak tabung, pipet tetes, larutan EDTA, larutan NaCl.

Bahan atau sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah darah vena dengan antikoagulan EDTA 10%.

Pengambilan darah Vena

Disiapkan alat dan bahan yang diperlukan untuk pengambilan darah vena. Dilabeli tabung dengan informasi yang benar. Pasien diarahkan pada posisi duduk yang nyaman Diletakkan lengan pasien diatas meja, dialasi sikunya dengan sebuah bantal kecil. Pasien diminta untuk mengepalkan tangannya supaya vena lebih terlihat jelas, dan dilakukan pembendungan dengan menggunakan tourniquet 3-5cm dari lipatan siku. Dibersihkan daerah kulit yang akan ditusuk dengan kapas alkohol 70% secara melingkar, biarkan mengering di udara Ditusuk vena dengan posisi spuit, sudut 15-30 derajat antara jarum dan kulit. Tourniquet dilepaskan dan pasien diminta membuka kepala tangannya. Jika volume darah sudah mencukupi untuk pemeriksaan, diletakkan kapas yang bersih dan kering diatas tempat penusukan. Dilepaskan jarum yang tertutupi kapas tersebut, lalu diberi tekanan pada kapas kering hingga darah berhenti mengalir. Dimasukkan darah ke dalam tabung, dihomogenkan dengan cara membolak balikkan tabung secara perlahan.. Ditempelkan plester pada tempat penusukan setelah darah berhenti

Pemeriksaan Kadar Hb dengan alat Hematology Analyzer

Alat Haematology analyzer dinyalakan dengan cara menghubungkan kabel power dengan stop kontak Dipastikan selang

pembuangan sudah terhubung ke jerigen limbah buangan. Dinyalakan dengan menekan tombol on atau off dibelakang alat, kemudian dibiarkan 10 menit (warming up). Dilakukan pencucian dengan dipilih menu maintenance, kemudian dicuci dengan cleanser khusus, kemudian zap dan flush. Dilakukan control dengan reagen control. Dimulai pemeriksaan sampel dengan memilih menu count, kemudian diatur mode dan diisi identitas pasien. Dipastikan sampel darah tidak lisis atau tidak menggumpal dan selalu homogen sebelum diperiksa, jika sudah dimasukkan sampel ke jarum penghisap dan ditekan tombol dibelakangnya, lalu di print hasil yang muncul. Dimatikan alat jika sudah tidak digunakan dengan memilih menu shutdown kemudian di tekan tombol on atau off dibelakang alat.

Pemeriksaan Osmotic fragility test (OFT)

Disiapkan 12 tabung dan diberi label nomor pada masing-masing tabung dari kiri ke kanan (25,24,23,22,21,20,19,18,17,16,15,14). Ditetaskan NaCl 0,5% pada masing-masing tabung, dengan jumlah tetesan banyaknya sesuai dengan nomor tabung. Ditetaskan aquadest pada tiap tabung, masing-masing tabung bervolume 25 tetes, digenapkan dengan penambahan aquadest. Ditambahkan darah satu tetes pada semua tabung. Dibiarkan pada suhu kamar selama satu jam sampai 2jam. Dibaca hasil pemeriksaan. Dibaca tabung mana yang terjadi permulaan hemolisis dan tabung mana yang terjadi hemolisis sempurna dan dicatat konsentrasi NaCl yang sesuai.

HASIL

Sampel sebanyak 20 orang diambil darah vena dan telah diperiksa kadar OFT dan Kadar Hb. Diperoleh gambaran kadar OFT dan Hb

berdasarkan kesesuaian, rerata, nilai normalnya. Gambar berikut adalah hasil OFT pada lisis permulaan dan lisis sempurna.

Berdasarkan gambar 2, eritrosit lisis pada konsentrasi 0,46% pada kadar Hb 15,0 g/dl, 15,50 g/dl, 15,7 g/dl, dan 15,8 g/dl. Ada 16 kadar OFT normal dari 16 kadar hemoglobin normal dan 4 kadar Hb dibawah normal yaitu 10,6 g/dl, 10,7 g/dl, 10,9 g/dl, dan 11,3 g/dl.

Berdasarkan tabel 1, rerata kadar OFT maupun Hb dalam batas normal, meskipun ada 4 kadar OFT diatas normal (< 0,44%) dan kadar Hb juga ada 4 dibawah normal. Secara keseluruhan memiliki kadar OFT maupun Hb dalam batas normal.

Berdasarkan hasil penelitian pada tabel 4 menunjukkan bahwa terdapat 4 responden yang mendapatkan hasil kadar Hb dibawah normal tetapi kadar OFT eritrositnya masih dalam batas normal. Kemudian terdapat 12 responden yang mendapatkan hasil kadar Hb normal dan kadar OFT eritrositnya dalam batas normal dan terdapat 4 responden yang mendapatkan hasil kadar Hb normal tetapi kadar OFT eritrositnya diatas kadar normal.

PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh kadar Kadar OFT ada 4 yang mengalami lisis sempurna pada konsentrasi 0,46%. Kadar hemoglobin dalam batas normal sebanyak 16 dan dibawah normal sebanyak 4. Kadar OFT dengan konsentrasi 0,46% terjadi pada kadar Hb ≥ 15 g/dl. Ada 4 kadar Hb yang nilainya dibawah normal/anemia ringan yaitu 10,6 g/dl sampai 11,3 g/dl diperoleh kadar OFT dalam dalam batas normal.

Hasil penelitian ini memberikan fenomena baru bahwa kadar Hb normal dengan nilai yang lebih tinggi yaitu ≥ 15 g/dl eritrositnya mengalami lisis sempurna pada pemeriksaan OFT,

sementara pada kadar Hb dibawah normal yaitu pada anemia ringan sel eritrositnya masih memiliki kekuatan untuk mempertahankan fragilitas membrannya.

Fragilitas dinding eritrosit dipengaruhi oleh komposisi plasma dan konsentrasi haemoglobin, bentuk eritrosit, dan umur eritrosit (Igbokwe, 2018)(Aldrich, 2012). Konsistensi plasma mudah berubah sehingga mempengaruhi bentuk eritrosit (Rodríguez-Varela et al., 2019)(da Silva Garrote-Filho et al., 2017). Membrane eritrosit mengandung lipoprotein yang berfungsi untuk melindungi eritrosit dalam mempertahankan perubahan media luar (Gyawali et al., 2014). Sel eritrosit sangat rentan terhadap kerusakan oksidatif karena konsentrasi oksigen dan hemoglobin sel yang tinggi (Demirkaya et al., 2018) (Atmaca et al., 2015).

Pada konsentrasi Hb ≥ 15 g/dl ada kemungkinan eritrosit mengalami perubahan bentuk dan lipoprotein tidak mampu melindungi larutan hipotosis sebagai media luarnya. Pada kadar Hb dibawah normal dalam batas anemia ringan ada kemungkinan eritrosit belum mengalami perubahan bentuk dan lipoprotein mampu melindungi membran eritrositnya sehingga tidak terjadi lisis (Tritschler et al., 2016). Sel darah merah bentuk normal mempunyai kemampuan kelenturan yang baik karena adanya flexibility yang didukung oleh ATP (Adenosine Triphosphate) yang mempersiapkan energy bagi Na^+/K^+ - ATPase yang menjaga lingkungan ion di dalam sel darah merah (Ellsworth & Sprague, 2012)(Harvey, 2022). Umur eritrosit juga merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi kadar OFT. Umur eritrosit yang sudah tua memiliki kerapuhan dinding eritrosit, meskipun kadar Hb nya normal maka fragilitasnya juga mengalami peningkatan. Umur

eritrosit yang kurang dari 120 hari misalnya pada anemia hemolitik, juga memiliki tingkat fragilitas yang tinggi. (Igbokwe, 2018) Ini adalah satu kajian yang dapat menjelaskan hasil dari penelitian.

KESIMPULAN

Rerata kadar OFT 0,37% dan kadar Hb 13,39 g/dl. Kadar OFT terkonfirmasi oleh kadar Hb, ada 4 kadar OFT dengan konsentrasi 0,46% mengalami lisis sempurna dengan kadar Hb \geq 15 g/dl. Kadar Hb dibawah normal yaitu anemia ringan, kadar OFT masih dalam batas normal.

SARAN

Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui hubungan kadar OFT dengan kadar haemoglobin.

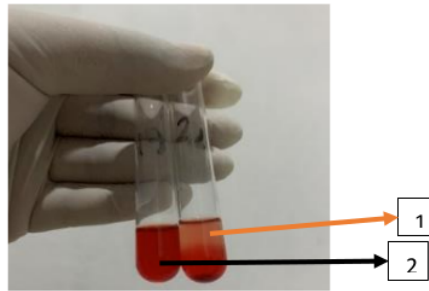
UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada program studi Teknologi Laboratorium Medis/Analisis Kesehatan Universitas Muhammadiyah yang telah memfasilitasi penggunaan laboratorium Patologi Klinik untuk keperluan penelitian ini.

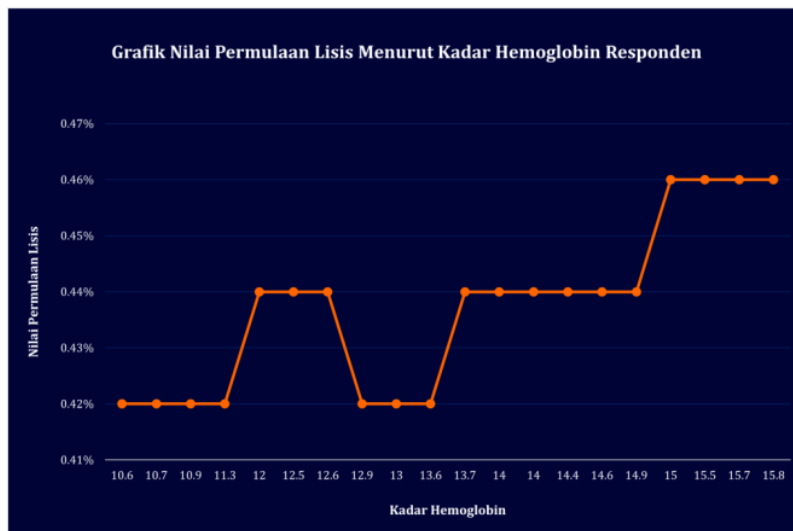
DAFTAR PUSTAKA

- Agus, R. T. A. (2017). *Prototype alat pendeteksi kadar oksigen dalam darah (hemoglobin/hb) menggunakan mikrokontroler atmega 8535*. *Jurteksi royal Vol 3 No 2, 3*.
- Aldrich, K. J. (2012). *Investigation of factors influencing erythrocyte osmotic fragility among selected ectothermic and endothermic vertebrates*.
- Amalia, D. (2021). *Teknik Data Mining pada Prediksi Klasifikasi Jenis Penyakit Anemia*. Universitas Multimedia Nusantara.
- Antwi-Baffour, S., Quao, E., Kyeremeh, R., & Mahmood, S. A. (2013). Prolong storage of blood in EDTA has an effect on the morphology and osmotic fragility of erythrocytes. *Int J Biomed Sci Eng, 1(2)*, 20–23.
- Arora, R. D., Dass, J., Maydeo, S., Arya, V., Radhakrishnan, N., Sachdeva, A., Kotwal, J., & Bhargava, M. (2018). Flow cytometric osmotic fragility test and eosin-5'-maleimide dye-binding tests are better than conventional osmotic fragility tests for the diagnosis of hereditary spherocytosis. *International Journal of Laboratory Hematology, 40(3)*, 335–342.
- Atmaca, N., Cinar, M., Guner, B., Kabakci, R., Gazyagci, A. N., Atmaca, H. T., & Canpolat, S. (2015). *Evaluation of oxidative stress, hematological and biochemical parameters during Toxoplasma gondii infection in gerbils*.
- Barcellini, W., & Fattizzo, B. (2015). Clinical applications of hemolytic markers in the differential diagnosis and management of hemolytic anemia. *Disease Markers, 2015*.
- Brodsky, R. A. (2015). Complement in hemolytic anemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 126(22)*, 2459–2465.
- Cappellini, M. D., & Motta, I. (2015). Anemia in clinical practice—definition and classification: does hemoglobin change with aging? *Seminars in Hematology, 52(4)*, 261–269.
- da Silva Garrote-Filho, M., Bernardino-Neto, M., & Penha-Silva, N. (2017). Influence of erythrocyte membrane stability in atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports, 19(4)*, 1–

7.
Demirkaya, K., Demirdöğen, B. C., Torun, Z. Ö., Erdem, O., & Tunca, Y. M. (2018). The effects of hydraulic calcium silicate containing endodontic materials on oxidative stress in erythrocytes and liver. *Turkish Journal of Biochemistry*, 43(3), 333–341.
- Ellsworth, M. L., & Sprague, R. S. (2012). Regulation of blood flow distribution in skeletal muscle: role of erythrocyte-released ATP. *The Journal of Physiology*, 590(20), 4985–4991.
- Gérard, D., Fattet, A., Brakta, C., Phulpin, A., Steschenko, D., Lesesve, J., & Perrin, J. (2017). Evaluation of OSMOCELLS, a new semi-automatic device for osmotic fragility assessment. *International Journal of Laboratory Hematology*, 39(5), 521–527.
- Goodnough, L. T., & Schrier, S. L. (2014). Evaluation and management of anemia in the elderly. *American Journal of Hematology*, 89(1), 88–96.
- Gyawali, P., Richards, R. S., Hughes, D. L., & Tinley, P. (2014). Erythrocyte aggregation and metabolic syndrome. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 57(1), 73–83.
- Haley, K. (2017). Congenital hemolytic anemia. *Medical Clinics*, 101(2), 361–374.
- Harvey, J. W. (2022). Erythrocyte biochemistry. *Schalm's Veterinary Hematology*, 166–171.
- Igbokwe, N. A. (2018). A review of the factors that influence erythrocyte osmotic fragility. *Sokoto Journal of Veterinary Sciences*, 16(4), 1–23.
- Phillips, J., & Henderson, A. C. (2018). Hemolytic anemia: evaluation and differential diagnosis. *American Family Physician*, 98(6), 354–361.
- Rismayanthi, C. (2016). Profil tingkat volume oksigen maskimal (VO2 max) dan kadar hemoglobin (HB) pada atlet Yongmoodo Akademi Militer Magelang. *Jorpres (Jurnal Olahraga Prestasi)*, 12(2).
- Rodríguez-Varela, M., García-Rubio, D., De la Mora-Mojica, B., Méndez-Méndez, J., Durán-Álvarez, C., & Cerecedo, D. (2019). Alterations to plasma membrane lipid contents affect the biophysical properties of erythrocytes from individuals with hypertension. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1861(10), 182996.
- Salvagno, G. L., Demonte, D., Dima, F., Bovo, C., & Lippi, G. (2020). Stability of refrigerated whole blood samples for osmotic fragility test. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*, 42, 134–138.
- Tritschler, C., Mizukami, K., Raj, K., & Giger, U. (2016). Increased erythrocytic osmotic fragility in anemic domestic shorthair and purebred cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 18(6), 462–470.
- Tvedten, H. (2022). Classification and laboratory evaluation of anemia. *Schalm's Veterinary Hematology*, 198–208.
- Zhang, L., HU, Z., Pan, J., WU, P., Zhou, R., & Zhu, Q. (2015). Discussion of Improved Examination Method of Osmotic Fragility Test. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 94–97.



Gambar 1. Pemeriksaan OFT, no 1 permulaan lisis, no 2 lisis sempurna



Grafik 1. Hasil Penelitian Kadar Hemoglobin dan OFT. Nilai normal OFT lisis pada konsentrasi 0,32%-.044%.

Tabel 1. Rerata kadar OFT dan Hb

| No | Variabel | Jumlah Sampel | Rerata | SD |
|----|----------|---------------|--------|------|
| 1 | OFT (%) | 20 | 0,37 | 1,67 |
| 2 | Hb g/dl | 20 | 13,39 | 0,01 |

Tabel 2. Kadar Hemoglobin dan OFT berdasarkan nilai normal

| Kadar Hb | Kadar OFT | | | £ |
|----------|-----------|----|----|----|
| | <N | N | >N | |
| <N | 0 | 4 | 0 | 4 |
| N | 0 | 12 | 4 | 16 |
| >N | 0 | 0 | 0 | 0 |

KONFIRMASI HASIL OSMOTIC FRAGILITY TEST (OFT) BERDASARKAN KADAR HEMOGLOBIN

ORIGINALITY REPORT

17%

SIMILARITY INDEX

16%

INTERNET SOURCES

5%

PUBLICATIONS

7%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

| | | |
|---|---|----|
| 1 | Submitted to Badan PPSDM Kesehatan Kementerian Kesehatan Student Paper | 5% |
| 2 | repository.itsk-soepraoen.ac.id Internet Source | 1% |
| 3 | journal.poltekkes-mks.ac.id Internet Source | 1% |
| 4 | id.123dok.com Internet Source | 1% |
| 5 | www.tuotromedico.com Internet Source | 1% |
| 6 | fr.scribd.com Internet Source | 1% |
| 7 | Budi Santosa, Arista Kurnia Budi Fristiani, Edi Dharmana, Fitriani Nur Damayanti, Heru Santoso Wahito Nugroho. "Immune Response (Serum Globulin) in BALB/c Mice after Hookworm Egg Protein Immunization as the Initial Stage of Developing Laboratory | 1% |

Diagnostics: An In Vivo Approach", Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences, 2022

Publication

| | | |
|----|--|-----|
| 8 | lib.unnes.ac.id Internet Source | 1 % |
| 9 | idoc.pub Internet Source | 1 % |
| 10 | Budi Santosa, Ali Rosidi, Herlisa Anggraini, Zahra Maharani Latrobdiba, Fitriani Nur Damayanti, Heru Santoso Wahito Nugroho. "Mask Protection Against Lead Exposure and Its Correlation with Erythropoiesis in Automotive Body Painters at Ligu District, Semarang, Indonesia", Journal of Blood Medicine, 2022 Publication | 1 % |
| 11 | ejurnal.undana.ac.id Internet Source | 1 % |
| 12 | jim.unsyiah.ac.id Internet Source | 1 % |
| 13 | jurnal.csdforum.com Internet Source | 1 % |
| 14 | www.scribd.com Internet Source | 1 % |
| 15 | kesmas.ulm.ac.id | |

Internet Source

<1 %

16

ocs.unud.ac.id

Internet Source

<1 %

17

www.slideshare.net

Internet Source

<1 %

18

123dok.com

Internet Source

<1 %

19

core.ac.uk

Internet Source

<1 %

20

pt.scribd.com

Internet Source

<1 %

Exclude quotes On

Exclude matches Off

Exclude bibliography On