

PENGARUH WAKTU PENGAMBILAN DAN LAMA PENYIMPANAN SALIVA PADA SUHU REFRIGERATOR TERHADAP TITER STATUS SEKRETOR

*The Effect Of Collection Time And Storage Duration Of Saliva At Refrigerator
Temperature On Secretor Status Titer*

Tiara Utami Putri ^{1*}, Ganjar Noviar ², Eem Hayati ³, Betty Nurhayati ⁴
Program Studi Sarjana Terapan, Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes
Kemenkes Bandung
Email: taeteara00@gmail.com

ABSTRACT

Saliva contains mucin glycoproteins that carry blood group specificity. Saliva can be affected by collection time, temperature, and storage duration. This study examines the secretor status titer in morning and evening saliva samples stored at refrigerator temperature (2-8°C) for 30 minutes, 60 minutes, and 90 minutes. The aim of this study is to determine the profile of secretor status titer and to observe the possible effects of collection time and storage duration of saliva at refrigerator temperature on secretor status titer. The type of research is quasi-experiment. This study uses 6 saliva samples with secretor status of blood group A using the agglutination inhibition method. The result of this study shows that morning saliva with variations in storage duration had a range of secretor status titer values of 1/16- \geq 1/512, while evening saliva samples shows a range of titer values of 1/8-1/256. Statistical test using Friedman and Wilcoxon test on saliva collection time yielded a p (sig) value of 0.001 meaning that there is an effect of saliva collection time on secretor status titer. Meanwhile, the Friedman and Wilcoxon test on the storage duration of saliva at refrigerator temperature (2-8°C) yielded a p (sig) value of 0.027 for the saliva data group stored for 90 minutes, meaning that there is an effect of storage duration on secretor status titer.

Key words: Secretor Status Titer, Saliva, Collection Time, Storage Duration.

ABSTRAK

Saliva mengandung glikoprotein musin yang membawa spesifitas golongan darah. Saliva dapat terpengaruh oleh waktu pengambilan, suhu, dan lama penyimpanan. Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan titer status sekretor saliva pagi dan saliva sore yang disimpan pada suhu *refrigerator* (2-8°C) selama 30 menit, 60 menit, dan 90 menit. Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui gambaran titer status sekretor dan melihat adakah pengaruh waktu pengambilan dan lama penyimpanan saliva pada suhu *refrigerator* terhadap titer status sekretor. Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimen semu. Penelitian ini menggunakan 6 sampel saliva berstatus sekretor golongan darah A dengan metode aglutinasi inhibisi. Hasil penelitian ini yaitu saliva pagi dengan variasi lama penyimpanan menunjukkan rentang nilai titer status sekretor 1/16 - \geq 1/512, sedangkan pada sampel saliva sore menunjukkan rentang nilai titer 1/8 - 1/256. Hasil uji statistik Friedman dan uji Wilcoxon terhadap waktu pengambilan saliva didapatkan nilai p (sig) 0,001, artinya terdapat pengaruh waktu pengambilan saliva terhadap titer status sekretor. Sedangkan hasil uji Friedman dan uji Wilcoxon terhadap lama penyimpanan saliva pada suhu *refrigerator* (2-8°C) didapatkan nilai p (sig) 0,027 pada kelompok data saliva yang disimpan 90 menit, artinya terdapat pengaruh lama penyimpanan saliva terhadap titer status sekretor.

Kata kunci: Titer Status Sekretor, Saliva, Waktu Pengambilan, Lama Penyimpanan.

PENDAHULUAN

Golongan darah ditentukan berdasarkan ada atau tidaknya antigen pada permukaan membran eritrosit.¹ Pemeriksaan golongan darah dapat dilakukan dari cairan tubuh lainnya salah satunya adalah saliva. Akan tetapi, penggunaan sampel saliva didasarkan pada individu tersebut harus berstatus sekretor.² Secara sederhana, seseorang dengan gen SeSe atau Sese dikenal sebagai sekretor, artinya seseorang tersebut mengeluarkan antigen golongan darah ke dalam cairan tubuhnya.³ Sedangkan seseorang dikatakan non sekretor jika memiliki genotip sese yang hanya mengeluarkan sedikit atau tidak sama sekali antigen golongan darahnya ke dalam cairan tubuhnya.⁴

Di antara semua cairan tubuh, saliva merupakan sumber yang kaya untuk menentukan status sekretor.⁵ Hal tersebut dikarenakan saliva mengandung glikoprotein yang disebut musin dimana 70% diantaranya merupakan karbohidrat yang terlarut dalam saliva termasuk antibodi (terutama IgA) dan beberapa diantaranya membawa spesifitas golongan darah (antigen ABH).⁶ Selain itu, antigen H yang merupakan prekursor yang menandakan adanya antigen A dan B hadir dalam bentuk terlarut yang ditemukan dalam saliva.⁷

Saliva merupakan sampel yang sangat sensitif, dipengaruhi oleh perubahan sistemik, fisiologis, dan biokimiawi dalam rongga mulut. Hal tersebut dapat berubah dikarenakan waktu pengambilan, suhu, dan metode penyimpanan.⁸ Saliva yang diambil pada pagi hari belum terstimulasi oleh faktor mekanis saat mengunyah makanan.⁹ Jika sudah terstimulasi oleh faktor mekanis tersebut menyebabkan produksi volume saliva menjadi lebih

banyak, akibatnya terjadi pengenceran dan antigen yang terbentuk seolah sedikit.¹⁰ Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Malianti tahun 2018 menyebutkan bahwa dari 16 responden terdapat 25% responden yang mengalami perubahan titer status sekretor pada sampel saliva pagi dan saliva 60 menit setelah makan, didukung penelitian yang dilakukan Faadhilah tahun 2022, didapatkan hasil dari 9 sampel terdapat 44,4% stabil dan 55,6% mengalami perubahan titer status sekretor pada sampel saliva pagi dan saliva siang.¹¹

Selain itu, jika terdapat penundaan pemeriksaan, sebaiknya dilakukan dengan menyimpan saliva dalam suhu rendah di *refrigerator* atau *freezer* karena dapat menjaga integritas sampel dengan memperlambat aktivitas bakterial dan enzimatis serta mencegah degradasi beberapa analit saliva.⁶ Waktu dari pengambilan sampel saliva sampai penyimpanan di dalam *refrigerator* sebaiknya kurang dari 2 jam. Berdasarkan penelitian Purwani tahun 2016, didapatkan terdapat perubahan nilai titer status sekretor pada sampel saliva segera dengan saliva yang disimpan selama 2 jam pada suhu 2-8°C.¹²

Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui gambaran titer status sekretor serta melihat adakah pengaruh waktu pengambilan dan lama penyimpanan saliva pada suhu *refrigerator* terhadap titer status sekretor.

METODE

Desain penelitian ini yaitu memberikan perlakuan terhadap sampel saliva yang dilakukan pengambilan di waktu pagi dan sore dengan variasi lama penyimpanan yaitu 30 menit, 60

menit, dan 90 menit pada suhu *refrigerator* (2-8°C). Pemeriksaan titer status sekretor dari sampel tersebut dilakukan dengan menggunakan metode aglutinasi inhibisi.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Hematologi Poltekkes Kemenkes Bandung pada tanggal 04 – 10 Mei 2023. Populasinya yaitu saliva mahasiswa/i Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Bandung. Sedangkan untuk sampelnya yaitu 6 orang mahasiswa/i yang memiliki status sekretor golongan darah A.

Data yang diperoleh adalah data primer dari hasil pemeriksaan titer status sekretor pada saliva pagi dan saliva sore dengan variasi lama penyimpanan pada suhu *refrigerator*. Setelah diperoleh data, dilanjutkan uji normalitas serta uji statistik non parametrik Friedman dan Wilcoxon.

Penelitian ini telah disetujui oleh komite etik dengan No. 36/KEPK/EC/IV/2023.

HASIL

Penelitian ini dilakukan pemeriksaan titer status sekretor pada sampel saliva yang diambil pada pagi hari dan sore hari, dimana masing-masing saliva diperiksa setelah penyimpanan selama 30 menit, 60 menit, dan 90 menit pada suhu *refrigerator* (2-8°C). Sejumlah 6 sampel saliva yang berasal dari mahasiswa/i Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Bandung yang berstatus sekretor A dipilih untuk penelitian ini. Proses penelitian diawali dengan melakukan validasi reagen sel A dengan zat anti A dan anti B yang digunakan untuk memastikan reagen sel A dalam keadaan valid dan didapatkan hasil +4 dengan anti A, sedangkan hasil – dengan anti B sehingga dapat disimpulkan bahwa reagen sel menunjukkan hasil valid.

Setelah reagen yang digunakan dipastikan valid, dilanjutkan dengan

validasi suhu *refrigerator* menggunakan termometer. Hasil yang didapatkan yaitu suhu pada rentang antara 3,7°C – 5,8°C, artinya suhu tersebut masih berada pada rentang 2-8°C. Hal tersebut menunjukkan bahwa *refrigerator* tersebut sudah valid.

Setelah itu dilakukan penentuan titer zat anti A dan didapatkan hasil 1/512. Selanjutnya sampel diperiksa titer status sekretornya.

Hasil dari penelitian titer status sekretor disajikan pada tabel 1.

Tabel 1 Hasil Penelitian

Sampel	Titer Sekretor					
	Golongan darah A					
	Saliva pagi			Saliva sore		
	30 menit	60 menit	90 menit	30 menit	60 menit	90 menit
1	1/128	1/128	1/128	1/64	1/64	1/64
2	1/32	1/32	1/32	1/16	1/16	1/16
3	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/32
4	1/32	1/16	1/16	1/16	1/8	1/8
5	21/512	21/512	21/512	1/256	1/256	1/256
6	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/32

Dari keenam sampel yang diperiksa, rentang nilai titer status sekretor pada sampel saliva pagi dengan variasi waktu penyimpanan menunjukkan titer minimumnya adalah 1/16 dan titer maksimumnya adalah $\geq 1/512$. Sementara itu, pada sampel saliva sore dengan variasi waktu penyimpanan menunjukkan titer minimumnya adalah 1/8 dan titer maksimumnya adalah 1/256.

Data hasil penelitian dilakukan uji normalitas yang disajikan pada tabel 2.

Tabel 2 Hasil Uji Normalitas

Kelompok	Kelompok	Nilai	Hasil	Kesimpulan
Data Waktu	Data Lama	Sig.		
Pengambilan	Penyimpanan			
Saliva Pagi	30 Menit	0,002	p<0,05	Distribusi Tidak Normal
	60 Menit	0,003	p<0,05	Distribusi Tidak Normal
	90 Menit	0,003	p<0,05	Distribusi Tidak Normal
Saliva Sore	30 Menit	0,007	p<0,05	Distribusi Tidak Normal
	60 Menit	0,012	p<0,05	Distribusi Tidak Normal
	90 Menit	0,003	p<0,05	Distribusi Tidak Normal

Data yang dihasilkan dari uji normalitas menunjukkan distribusi data tidak normal. Selanjutnya diuji dengan uji non parametrik Friedman yang disajikan pada tabel 3.

Tabel 3 Hasil Uji Friedman Terhadap Waktu Pengambilan

Kelompok	Nilai sig.	Hasil	Kesimpulan
Data Waktu			
Pengambilan			
Saliva Pagi	0,000	p<0,05	Ada perbedaan
Saliva Sore	0,000	p<0,05	Ada perbedaan

Berdasarkan tabel 3, hasil uji Friedman untuk pengaruh waktu pengambilan saliva pagi dan saliva sore menunjukkan nilai p (sig) 0,000 artinya terdapat perbedaan yang bermakna pada waktu pengambilan sampel saliva pagi dan saliva sore terhadap titer status sekretor.

Setelah didapatkan hasil uji Friedman kemudian dilanjutkan dengan uji Wilcoxon untuk melihat pengaruhnya yang ditunjukkan pada tabel 4.

Tabel 4 Hasil Uji Wilcoxon Terhadap Waktu Pengambilan

Kelompok Data	Sig.	Hasil	Kesimpulan
Saliva pagi vs Saliva sore	0,001	P<0,05	Ada perbedaan

Dari tabel 4 dapat dilihat hasil uji non parametrik Wilcoxon pada kelompok data saliva pagi dan saliva sore menunjukkan nilai p (sig) 0,001, artinya terdapat perbedaan yang bermakna pada saliva pagi dan saliva sore terhadap titer status sekretor.

Sedangkan, untuk hasil uji Friedman terhadap lama penyimpanan saliva pagi dan saliva sore selama 30 menit, 60 menit, dan 90 menit pada suhu *refrigerator* disajikan pada tabel 5.

Tabel 5 Hasil Uji Friedman Terhadap Lama Penyimpanan Pada Suhu Refrigerator

Kelompok	Lama	Nilai	Hasil	Kesimpulan
Data Waktu	Penyimpanan	sig.		
Pengambilan				
Saliva Pagi	30 Menit	0,001	p<0,05	Ada Perbedaan
	60 Menit	0,001	p<0,05	Ada Perbedaan
	90 Menit	0,001	p<0,05	Ada Perbedaan
Saliva Sore	30 Menit	0,001	p<0,05	Ada Perbedaan
	60 Menit	0,001	p<0,05	Ada Perbedaan
	90 Menit	0,001	p<0,05	Ada Perbedaan

Berdasarkan tabel 5 menunjukkan nilai p (sig) 0,001 artinya terdapat perbedaan yang bermakna pada sampel saliva pagi dan saliva sore yang masing-masing diperiksa setelah penyimpanan di suhu *refrigerator* selama 30 menit, 60 menit, dan 90 menit.

Selanjutnya dilakukan uji Wilcoxon untuk melihat pengaruhnya yang ditunjukkan hasilnya pada tabel 6.

Tabel 6 Hasil Uji Wilcoxon Terhadap Lama Penyimpanan Pada Suhu Refrigerator

Kelompok Data	Sig.	Hasil	Kesimpulan
Saliva pagi 30 menit vs Saliva sore 30 menit	0,066	p>0,05	Tidak ada perbedaan
Saliva pagi 60 menit vs Saliva sore 60 menit	0,061	p>0,05	Tidak ada perbedaan
Saliva pagi 90 menit vs Saliva sore 90 menit	0,027	p<0,05	Ada perbedaan

Dari tabel 6 dapat dilihat hasil uji non parametrik Wilcoxon pada kelompok data saliva yang disimpan selama 90 menit menunjukkan nilai p (sig) 0,027, artinya terdapat perbedaan yang bermakna.

PEMBAHASAN

Berdasarkan tabel 1 terlihat bahwa terdapat perbedaan yang bermakna pada sampel saliva yang diambil pada dua waktu pengambilan yaitu saliva pagi dan saliva sore terhadap nilai titer status sekretor. Dari keenam subjek saliva pagi yang diperiksa menunjukkan titer minimumnya yaitu 1/16 dan titer maksimumnya yaitu $\geq 1/512$. Sedangkan pada sampel saliva sore menunjukkan titer minimumnya adalah 1/8 dan titer maksimumnya adalah 1/256.

Secara uji statistika menggunakan uji Friedman terhadap waktu pengambilan saliva dihasilkan terdapat perbedaan yang bermakna pada dua waktu pengambilan yaitu saliva pagi dan saliva sore yang kemudian dilanjutkan dengan uji Wilcoxon dan dihasilkan terdapat perbedaan yang bermakna pada saliva pagi dan saliva sore dengan nilai sig sebesar 0,001.

Perbedaan titer status sekretor antara saliva pagi dan saliva sore dikarenakan adanya stimulasi faktor mekanis saat mengunyah makanan pada sampel saliva sore. Setelah makan atau minum, sampel saliva mengandung inhibitor yang diturunkan dari makanan sehingga dapat mengurangi tingkat deteksi dan konsentrasi antigennya.¹¹ Sedangkan pada saliva pagi belum ada stimulasi dari makanan dan minuman sehingga komposisi saliva tidak terpengaruh. Selain itu, produksi saliva tidak konstan dalam jumlah besar, melainkan pada waktu-waktu tertentu saja. Sekresi saliva meningkat dimana laju aliran tertinggi di sore hari dan terendah selama waktu tidur.¹³ Perubahan laju saliva dapat mempengaruhi volume saliva yang dapat disebabkan karena faktor mekanis seperti makanan. Akan tetapi, kekuatan ekspresi antigen individu berpengaruh lebih besar pada perubahan titer status sekretor.¹⁴ Hal tersebut selaras dengan penelitian Malianti tahun 2018 menyebutkan dari 16 responden terdapat 25% yang

mengalami perubahan titer status sekretor pada saliva pagi dan 60 menit setelah makan, didukung penelitian Faadhilah tahun 2022 yang menyebutkan bahwa dari kesembilan data saliva yang diambil pada pagi dan siang hari menunjukkan 5 orang (55,6%) mengalami perubahan titer status sekretor pada siang hari namun tidak mempengaruhi status sekretornya.¹¹

Sementara itu, pada tabel 1 diketahui bahwa terdapat perbedaan yang bermakna titer status sekretor pada sampel saliva yang dilakukan penyimpanan selama 30 menit, 60 menit, dan 90 menit pada suhu *refrigerator* (2-8°C). Dari keenam subjek saliva pagi dan sore yang disimpan 30 menit menunjukkan titer minimumnya yaitu 1/16 dan titer maksimumnya adalah $\geq 1/512$, kemudian saliva yang disimpan 60 menit titer minimumnya yaitu 1/8 dan titer maksimumnya $\geq 1/512$, serta saliva yang disimpan 90 menit titer minimumnya yaitu 1/8 dan titer maksimumnya $\geq 1/512$, yang artinya semakin lama sampel saliva disimpan maka nilai titer status sekretornya mengalami penurunan.

Selanjutnya dilakukan uji statistika menggunakan uji Friedman terhadap lama penyimpanan saliva dan dihasilkan terdapat perbedaan yang bermakna antara saliva pagi dengan saliva sore yang masing-masing disimpan pada 30 menit, 60 menit, dan 90 menit pada suhu *refrigerator*, kemudian dilanjutkan uji Wilcoxon dan dihasilkan pada kelompok data saliva pagi dan saliva sore yang disimpan selama 90 menit pada suhu *refrigerator* memiliki perbedaan yang bermakna dengan nilai sig sebesar 0,027, dimana dari 6 orang sampel, sebanyak 6 orang mengalami penurunan 1 kali titer status sekretor namun tidak mempengaruhi status sekretornya.

Pada penelitian ini, saliva disimpan selama 30 menit, 60 menit, dan 90 menit pada suhu *refrigerator* (2-8°C) karena pada rentang suhu tersebut dapat

memperlambat aktivitas kimiawi, bakterial, dan enzimatis pada saliva. Penyimpanan yang stabil tersebut sangat penting agar biomarker protein pada saliva tetap terjaga. Selain itu dalam penelitian Purwani tahun 2016 menyebutkan bahwa waktu dari pengambilan sampel saliva sampai penyimpanan di dalam *refrigerator* sebaiknya kurang dari 2 jam sedangkan di dalam freezer tidak boleh melebihi 5 jam. Dari hasil penelitian tersebut disebutkan bahwa terdapat perbedaan titer status sekretor pada saliva segera dan disimpan selama 2 jam dan 3 jam pada suhu 2-8°C ditandai dengan adanya penurunan titer yang signifikan.¹²

Selain itu, berdasarkan penelitian dan uji statistik, ditemukan bahwa hanya pada kelompok data saliva yang disimpan selama 90 menit dalam suhu *refrigerator* terdapat perbedaan yang signifikan terhadap titer status sekretor. Hal ini disebabkan oleh kekuatan gen sekretor yang dimiliki setiap individu berbeda-beda. Sekretor adalah orang yang memiliki gen SeSe atau Sese, yang memungkinkannya untuk mensekresikan antigen golongan darah ke dalam cairan tubuh seperti saliva.¹⁵ Golongan darah tidak menentukan status sekretor atau kekuatan antigen individu. Nilai titer yang tidak berubah disebabkan oleh reaksi antigen dan antibodi yang berbeda pada setiap individu. Hal ini menunjukkan bahwa kekuatan antigen setiap individu berbeda. Individu dengan gen sekretor yang tidak dominan mengalami perubahan titer dalam pemeriksaan titer status sekretor, sementara individu dengan gen sekretor yang dominan tidak mengalami perubahan titer.¹⁴

SIMPULAN

Hasil uji statistik Friedman dan uji Wilcoxon terhadap waktu pengambilan saliva didapatkan terdapat pengaruh waktu pengambilan saliva terhadap titer status sekretor. Sedangkan hasil uji

Friedman dan uji Wilcoxon terhadap lama penyimpanan saliva pada suhu *refrigerator* (2-8°C) didapatkan terdapat pengaruh lama penyimpanan pada kelompok data saliva yang disimpan 90 menit terhadap titer status sekretor.

DAFTAR RUJUKAN

1. Zahra SA. *Studi Literatur Hubungan Status Sekretor Pada Spesimen Biologis Terhadap Risiko Penyakit Infeksi*. Poltekkes Kemenkes Bandung; 2021.
2. Durachim A, Nurhayati B, Rohayati. *Pembuatan Antibodi Anti - H Dari Serum Kelinci Yang Diinduksi Dengan Eritrosit Golongan Darah O Untuk Pemeriksaan Status Sekretor*. Poltekkes Kemenkes Bandung; 2017.
3. Metgud R. Evaluation of the Secretor Status of ABO Blood Group Antigens in Saliva among Southern Rajasthan Population Using Absorption Inhibition Method. *J Clin DIAGNOSTIC Res*. 2016;3(4):127-131. doi:10.7860/JCDR/2016/11598.7161
4. Alqadri A, Rofinda ZD, Susanti R. Gambaran Golongan Sekretor dan Nonsekreter yang Diperiksa Melalui Saliva Mahasiswa Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Andalas. *J Kesehatan Andalas*. 2016;5(1):20-24. doi:10.25077/jka.v5i1.433
5. Thiagarajan S, Stephen S, Kanagamuthu S, et al. Does Secretor Status of ABO Blood Group in Saliva Influence the Risk of Hypertension and Urinary Tract Infection in Diabetic Patients? *J Med Sci Clin Res*. 2019;7(5). doi:10.18535/jmscr/v7i5.27
6. Voegtline KM, Granger DA. Dispatches from the interface of salivary bioscience and neonatal research. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5(MAR):1-9. doi:10.3389/fendo.2014.00025

7. Aliviameita A. *Buku Ajar Mata Kuliah Imunohematologi*. Umsida Press; 2020. doi:10.21070/2020/978-623-6833-44-5
8. Kaur J, Jacobs R, Huang Y, Salvo N, Politis C. Salivary biomarkers for oral cancer and pre-cancer screening: a review. *Clin Oral Investig*. 2018;22(2):633-640. doi:10.1007/s00784-018-2337-x
9. Nazara LL. Laju Aliran Saliva dan pH Saliva pada Pasien Gagal Ginjal Kronik yang Menjalani Hemodialisis di RSUP H. Adam Malik Medan. Published online 2019. <http://repositori.usu.ac.id/handle/123456789/24220>
10. Salimetrics, L.L.C., SalivaBio LLC. Saliva Collection and Handling Advice. *Methods*. 2015;44(0):1-15. www.salimetrics.com
11. Faadhilah FG. *Pengaruh Waktu Pengambilan Spesimen Saliva Dan Urine Terhadap Titer Status Sekretor*. Poltekkes Kemenkes Bandung; 2022.
12. Purwani H. *Pengaruh Waktu Penyimpanan Spesimen Saliva Terhadap Titer Status Sekretor*. Politeknik Kesehatan Kemenkes Bandung; 2016.
13. Nakova M, Bozhinov Sredovska A. A Review of Saliva: Secretion, Composition and Function. *Vol 2, 2*. 2020;2(June). doi:10.20959/wjpps20206-16334
14. Malianti N. *Perbandingan Titer Status Sekretor Pada Pengambilan Spesimen Saliva Pagi Dan 60 Menit Setelah Makan*. Politeknik Kesehatan Bandung; 2018.
15. Metgud R, Khajuria N, Mamta, Ramesh G. Evaluation of the secretor status of abo blood group antigens in saliva among southern rajasthan population using absorption inhibition method. *J Clin Diagnostic Res*. 2016;10(2):ZC01-ZC03. doi:10.7860/JCDR/2016/11598.716