

PENGARUH PENAMBAHAN ALFA SIKLODEKSTRIN TERHADAP PLASMA LIPEMIK PADA PEMERIKSAAN PROTHROMBIN TIME (PT) DENGAN METODA MANUAL

Rani Handriani¹, Yesi Nurfitriani², Dani Mahmud³

^{1,2,3} Analis Kesehatan, Sekolah Tinggi Analis Bakti Asih Bandung,
Jalan Padasuka Atas No. 233, Bandung 40192, Indonesia

ranihandriani@gmail.com, vesv.nurfitriani19@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh penambahan alfa-siklodekstrin terhadap plasma lipemik pada nilai *Prothrombin Time* (PT) dengan metoda manual. Metode penelitian ini bersifat eksperimen, melakukan modifikasi plasma sitrat menjadi 5 kelompok yaitu plasma sitrat tidak lipemik sebagai kontrol, plasma lipemik sedang tanpa siklo, plasma lipemik sedang dengan siklo, plasma lipemik berat tanpa siklo dan plasma lipemik berat dengan siklo. Pemeriksaan PT (*Prothrombin time*) dilakukan dengan metode *Quick One Stage*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada uji *Kruskal Wallis* menghasilkan taraf signifikansi $0,001 < 0,05$ maka terdapat perbedaan yang signifikan. Taraf signifikansi pada penelitian menjelaskan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan terhadap penambahan *Alfa-siklodekstrin* pada pemeriksaan *prothrombine time*. Sehingga dapat disimpulkan dari data penelitian yang didapatkan bahwa *alfa-siklodekstrin* tidak dapat digunakan untuk mengatasi plasma lipemik pada pemeriksaan PT karena dapat memperpanjang nilai PT secara signifikan.

Kata Kunci : *Lipemik, Alfa-Siklodekstrin, Prothrombin Time*

ABSTRACT

This study aim to determine the effect of addition of alpha-cyclodextrin to lipemic plasma on the value of Prothrombin Time (PT) by manual method. This research method was experimental, modifying citrate plasma into 5 groups, namely non-lipemic citrate plasma as a control, moderate lipemic plasma without cyclo, moderate lipemic plasma with cyclo, severe lipemic plasma without cyclo and heavy lipemic plasma with cyclo. PT (Prothrombin time) examination was carried out using the Quick One Stage method. The results showed that the Kruskal Wallis test resulted in a significance level of $0.001 < 0.05$, so there was a significant difference. The level of significance in the study explained that there was a significant effect on the addition of alpha-cyclodextrin on the prothrombine time examination. So it can be concluded from the research data obtained that alpha-cyclodextrin cannot be used to treat lipemic plasma in PT examination because it can significantly extend the PT value.

Keywords : *Lipemic, Alfa-Cyclodextrin, Prothrombin Time.*

1. PENDAHULUAN

Hemostasis adalah suatu proses penghentian perdarahan. Pemeriksaan PT dilakukan bersama APTT untuk mengetahui adanya perdarahan berlebih atau gangguan pembekuan darah. Tes ini sebagai diagnosa dalam memberikan informasi apakah perlu melakukan tindakan lebih lanjut atau tidak. Biasanya dilakukan oleh seseorang yang hendak melakukan tindakan operasi

karena untuk menghindari terjadinya pendarahan berlebih pada saat operasi berlangsung. Pemanjangan nilai PT dapat dijumpai pada penyakit hati (sirosis hati, hepatitis, kanker hati, abses hati, ikterus), defisiensi factor (II, V, VII, X), fibrinolysis, gangguan reabsorpsi usus, penggunaan alkohol dan pemakaian obat-obatan tertentu (vitamin K, antibiotic, antikoagulan oral) (Wiyata, B.2014).

Secara spontan sebagai respon terhadap pembuluh darah yang rusak. Mekanisme yang berperan terjadi melalui tiga langkah utama yaitu respon terhadap kerusakan pembuluh darah yang melibatkan faktor-faktor pembekuan darah dengan hasil akhirnya adalah activator protrombin. Activator factor protrombin mengkatalisis perubahan protrombin menjadi trombin. Trombin bekerja sebagai enzim untuk mengubah fibrinogen menjadi benang fibrin membentuk bekuan (Durachim, 2018). Pemeriksaan hemostasis meliputi beberapa pemeriksaan yaitu hitung trombosit, dotting time, bleeding time, rumple leed (pembendungan), prothrombin time (PT) dan activated partial tromboplastin time (APTT) (Aulia D, 2007). Prothrombin time adalah uji lamanya waktu pembekuan darah di jalur ekstrinsik dan jalur bersama (common pathway). Uji ini dilakukan untuk mengetahui adanya kelainan perdarahan (Misnah dkk, 2011).

Faktor-faktor yang mempengaruhi pemeriksaan PT antara lain kesalahan pada saat pengambilan sampel, terbentuknya bekuan darah dapat terjadi karena proses homogenisasi darah dengan antikoagulan yang tidak sempurna dan penundaan sampel plasma yang terlalu lama dapat menyebabkan perubahan fisik dan kimiawi yang mempengaruhi hasil (Bakta, 2006). Selain itu sampel yang hemolisis, ikterik, dan lipemik juga sangat mempengaruhi akurasi dari sebuah hasil pemeriksaan laboratorium (Calmarza and Corderro, 2011). Di laboratorium sering dijumpai plasma yang lipemik. Plasma lipemik adalah plasma yang berwarna keruh, putih atau seperti susu karena hiperlipidemia. Penyebab yang paling umum dari kekeruhan tersebut adalah peningkatan konsentrasi trigliserida (Masruroh A, 2014). Plasma lipemik memiliki partikel lipid besar yang meliputi lipoprotein yaitu kilomikron. Akibatnya, meningkatkan kekeruhan pada sampel dan dapat mengakibatkan pemendekan atau perpanjangan hasil koagulasi sehingga dapat mempengaruhi hasil pada pemeriksaan (Sacher, R. 2004).

Lipoprotein yang terakumulasi pada plasma lipemik dapat mengganggu hasil pemeriksaan karena pada factor pembekuan terdapat inhibitor lintasan factor jaringan (TFPI: tissue factor fatway inhibitor) yang merupakan inhibitor fisiologik utama yang menghambat koagulasi. Inhibitor ini berupa protein yang beredar didalam darah dan terikat lipoprotein. TFPI ini menghambat langsung factor Xa dengan terikat pada enzim tersebut didekat tempat aktifnya. Kemudian kompleks factor Xa-TFPI menghambat kompleks factor VIII-faktor jaringan. Maka apabila pada plasma lipemik, TFPI yang sudah berikatan dengan lipoprotein ini akan mengikat lipoprotein yang lebih banyak sehingga akan semakin menghambat proses pembekuan darah. Hal tersebut yang mengakibatkan hasil pemeriksaan PT menjadi memanjang (Durachim, 2018). Alternatif untuk menangani sampel lipemik dapat menggunakan beberapa metode yaitu; ultrasentrifugasi, pengenceran sampel, dan flokulasi lipoprotein salah

satunya dengan alfa- siklodekstrin. Alfa Siklodekstrin wujudnya berupa serbuk, merupakan kelompok oligosakarida nonpereduksi yang terdiri dari 6 unit glukosa produk modifikasi pati dengan struktur kimia berbentuk cincin. Alfa Siklodekstrin memiliki permukaan luar yang bersifat hidrofilik sedangkan bagian dalam rongganya bersifat hidrofobik, dengan sifatnya tersebut, maka siklodekstrin dapat mengikat lemak di dalam serum. Toksisitas dari zat siklodekstrin alami maupun turunannya telah banyak diteliti dan terbukti atoksik (Izzati dan Ani Riyani, 2018).

Penurunan kadar trigliserida modifikasi serum lipemik buatan setelah dilakukan perlakuan dengan alfa-siklodekstrin disebabkan oleh lipid dalam sampel lipemik dan molekul siklodekstrin yang saling mendekat lalu terjadi interaksi hidrofobik antara gugus fungsi molekul lipid dengan gugus yang terletak dalam rongga tengah siklodekstrin sehingga dapat terjadi pembentukan ikatan antara molekul lipid dan siklodekstrin. Setelah terjadi pengikatan, diperlukan proses sentrifugasi untuk mengendapkan lipemik yang telah berikatan dengan molekul siklodekstrin (Izzati dan Ani Riyani, 2018).

Siklodekstrin menjadi senyawa yang paling penting karena memiliki kemampuan dalam membentuk inklusi kompleks dan sifat-sifat kompleksnya dapat dimodifikasi secara signifikan seperti stabilitas, kelarutan, dan bioavailabilitas dalam bidang farmasi, industry makanan, kimia dan kosmetik. Keistimewaan dari siklodekstrin terletak pada struktur cincinnya dan kemampuannya untuk melingkupi molekul guest ke dalam rongga siklodekstrin. Siklodekstrin sebagai penstabil emulsi, mampu menutup bau, rasa pahit pada obat dan dapat mengurangi kadar kolesterol. Kegunaan alfa siklodekstrin diklaim sebagai stabilizer produk makanan untuk vegetarian dan penderita kolesterol selain itu alfa-siklodekstrin sudah banyak diteliti, lebih mudah didapat dan harganya pun lebih terjangkau. Dari penelitian sebelumnya Fenny Mutiasari tahun 2019, tentang “pengaruh variasi tingkat lipemik pada pemeriksaan PT” dengan menggunakan 10 sampel yang dimodifikasi menjadi 3 variasi plasma sitrat lipemik didapatkan hasil pada variasi plasma sitrat lipemik memiliki pengaruh yang signifikan terhadap nilai PT (Mutiasari, 2019).

Pada penelitian dilakukan modifikasi pada plasma sitrat menjadi 2 variasi yaitu plasma sitrat lipemik sedang dan plasma sitrat lipemik berat dengan menggunakan kuning telur ayam. Kuning telur merupakan produk unggas selain daging yang memiliki gizi yang tinggi serta banyak diminati oleh masyarakat karena mudah didapat dan harganya pun terjangkau. Kandungan yang terdapat dalam kuning telur terdiri dari air (72,875,6%), protein (12,8-13,4%) dan lemak (10,5-11,18%) (Umar, 2017).

2. METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini adalah merupakan rancangan Eksperimen. Menurut Sugiyono (2009) metode penelitian eksperimen adalah metode penelitian yang digunakan untuk mencari pengaruh perlakuan tertentu terhadap yang lain dalam kondisi yang terkendali. Dalam penelitian ini digunakan plasma lipemik dengan dan tanpa penambahan alfa siklodekstrin dengan perbandingan dan 1:10. Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah true eksperimen dengan pendekatan pretest, post test control group design. Dalam rancangan ini terdapat dua kelompok yang dipilih secara acak. Kelompok pertama tidak diberi perlakuan (Kelompok Control) dan kelompok kedua diberi perlakuan (Kelompok Eksperimen).

Alat dan Bahan

Alat dan Bahan yang digunakan pada penelitian ini Sentrifuge, Tabung Na Sitrat, Waterbath, Tabung reaksi, Stopwatch, Mikropipet, Tip, Ose, Tissues, Tomiquet, Sput, Kapas Alkohol, Rak Tabung, Fotometer, Cawan Petri, Reagen PT (Kalsium tromboplastin, yaitu tromboplastin jaringan dalam larutan (CaCh)), Plasma sitrat lipemik, Larutan Alfa Siklodekstrin, Kuning Telur Ayam, untuk modifikasi serum lipemik, dan NaCl Fisiologis.

3. PROSEDUR KERJA

1) Pengenceran Reagen Prothombin Time

Disiapkan alat dan bahan yang di perlukan. Ditambahkan 4 ml aquades ke dalam reagen prothombin. Dihomogenkan.

2) Pengambilan Darah Vena

Disiapkan alat dan bahan yang diperlukan. Torniquet dipasang beberapa cm (± 3 jari) di atas lipatan siku. Dipilih bagian vena median cubital atau cephalic dengan melakukan perabaan. Dibersihkan kulit pada bagian yang akan diambil darahnya dengan kapas alkohol 70%. Jarum ditusukkan pada pembuluh darah vena dengan posisi jarum berlubang menghadap ke atas dan posisikan pada 15-30°. Setelah mengenai vena, lepas torniquet dan tarik semprit hingga darah keluar. Jarum dilepas dan diletakkan kapas kering pada tempat penusukan dan diberi plaster.

3) Pembuatan Plasma Sitrat Lipemik Sedang (500-799 mg/dL)

Disiapkan alat dan bahan. Dibuat pengenceran kuning telur 6x (100 pl kuning telur diencerkan dalam 500 pl NaCl Fisiologis). Dibuat modifikasi serum lipemik sedang (100 pl serum + 30 pl pengenceran kuning telur). Diberi label.

4) Pembuatan Plasma Sitrat Lipemik Berat (800-1800 mg/dL)

Disiapkan alat dan bahan. Dibuat pengenceran kuning telur 2x (100 pl kuning telur diencerkan dalam 100 pl NaCl Fisiologis). Dibuat modifikasi serum lipemik Berat (100 pl serum + 30 pl pengenceran kuning telur). Diberi label.

5) Pemeriksaan Trigliserida

Disiapkan alat dan bahan. Dicampur hingga homogen. Diinkubasi selama 20 menit pada suhu 20-25°C. Diukur absorbansi sampel dan standard terhadap blanko pada panjang gelombang 546 nm.

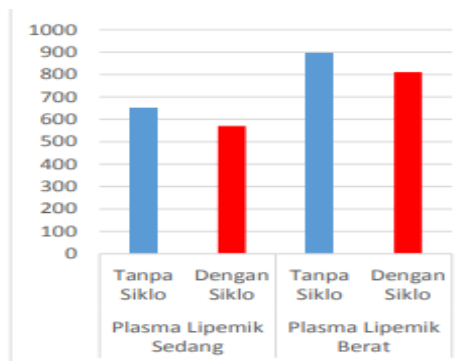
6) Pembuatan Larutan Alfa Siklodekstrin 0,5 %

Ditimbang 0,05 gram alfa- siklodekstrin pada neraca teknis. Dilarutkan dalam 10 ml aquades dan homogenkan. Disimpan dalam wadah dan diberi label.

7) Pengolahan Plasma Lipemik Dengan Alfa Siklodekstrin 0.5 % (1:10):

Dipipet 100 pl plasma lipemik. Ditambahkan 10 pl Larutan Alfa Siklodekstrin 0,5%. Didiamkan selama 10 menit. Disentrifuge 3000 rpm selama 10 menit.

8) Pemeriksaan PT :



Gambar 4.1. Diagram Pengaruh Alfa-siklodekstrin terhadap hasil trigliserida pada Plasma Lipemik

Disiapkan alat dan bahan. Reagen dikondisikan pada suhu 37°C. Diambil 50 pl plasma sitrat lipemik, lalu inkubasi pada suhu 37°C pada waterbath selama 2 menit. Ditambah sebanyak 100 pL reagen PT, pada saat reagent dimasukkan stopwatch dijalankan lalu dikail-kail sampai terbentuk fibrin. Stopwatch dihentikan dan dicatat waktunya.

4. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian pengaruh penambahan alfa siklodekstrin terhadap plasma lipemik pada pemeriksaan PT dengan metode manual dilakukan pada 10 sampel dengan pengulangan 2 kali atau duplo. Pada penelitian ini melakukan variasi sampel plasma sitrat dengan membagi menjadi 5 kelompok yaitu plasma sitrat tidak lipemik sebagai kontrol, plasma lipemik sedang tanpa alfa siklodekstrin, plasma lipemik sedang dengan alfa siklodekstrin, plasma lipemik berat tanpa alfa siklodekstrin dan plasma lipemik berat dengan alfa siklodekstrin.

Tabel 1. Hasil pemriksaan Trigliserida pada plasma lipemik dengan dan tanpa siklo

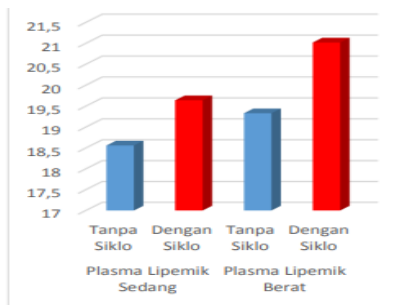
Sampel	Hasil Trigliserida (mg/L)				
	Plasma				Tidak lipemik
	Lipemik Sedang		Lipemik Berat		
	Tanpa Siklo	Dengan Siklo	Tanpa Siklo	Dengan Siklo	
1	669	603	822	826	124
2	695	577	848	780	126
3	730	624	843	762	115
4	654	552	863	830	119
5	553	513	918	828	113
6	677	547	898	790	117
7	610	522	854	769	125
8	586	518	896	753	123
9	587	527	884	724	131
10	621	571	796	736	133
11	644	524	865	736	144
12	652	612	833	720	146
13	697	557	896	878	121
14	615	535	966	873	129
15	638	594	1050	922	148
16	692	568	1000	897	152
17	683	750	894	764	136
18	655	534	920	851	146
19	671	607	923	876	144
20	659	565	962	891	146
Rata-rata	649	570	896.55	810.3	131.9

Tabel.2 Hasil Pemeriksaan PT

Sampel	Hasil pemeriksaan Protombin Time (detik)				
	Plasma				Tidak Lipemik
	Lipemik sedang		Lipemik Berat		
	Tanpa Siklo	Dengan Siklo	Tanpa Siklo	Dengan Siklo	
1	17.5	19.18	18.98	20.85	14.02
2	18.44	20.27	20.65	21.97	13.86
3	18.03	18.84	18.2	19.42	13.53
4	19.38	21.47	20.21	21.84	13.49
5	18.02	21.22	18.59	21.23	13.76
6	18.11	20.67	18.39	22.13	13.22
7	17.91	18.54	18.5	19.5	14.12
8	19.36	20.67	20.1	21.13	13.96
9	17.3	18.33	18.1	19.12	13.45
10	18.13	20.05	20.03	21.19	13.97
11	18.1	18.33	19.12	20.74	14.52
12	19.15	19.97	20.25	21.21	14.22
13	18.67	19.87	19.87	20.87	14.12
14	18.54	20.33	20.1	21.22	14.55
15	19.54	20.32	21.14	21.73	15.02
16	19.05	20.14	20.65	21.98	14.79
17	18.44	19.13	19.32	21.46	13.7
18	19.01	20.76	20.53	21.54	14.48
19	18.42	19.12	19.61	20.26	13.76
20	18.56	19.64	19.33	21.02	14.01
Rata-rata	18.483	19.8425	19.5835	21.0205	14.0275

Berdasarkan diagram diatas pengaruh alfa-siklodekstrin pada plasma lipemik menunjukkan hemostasi snya rendah dengan data pada plasma lipemik sedang yang tanpa siklo menunjukkan rata-rata 649 sedangkan yang menggunakan siklo rata-rata 570.

detik



Gambar 4.2. Diagram Pengaruh Alfa-Siklodekstrin terhadap Pemeriksaan PT (detik)

Berdasarkan gambar diagram diatas menunjukkan bahwa nilai PT plasma lipemik yang menggunakan siklo mempunyai waktu lebih lama dengan plasma lipemik yang tidak menggunakan siklodekstrin.

Dari hasil penelitian uji normalitas pemeriksaan PT menggunakan kolmogrov-Smirnov pada plasma tidak lipemik didapatkan nilai sig $0,200 > 0,05$, plasma lipemik sedang tanpa alfa-siklodekstrin didapatkan nilai sig $0,200 > 0,05$, plasma lipemik sedang dengan penambahan alfa-siklodekstrin didapatkan nilai sig $0,200 > 0,05$, plasma lipemik berat tanpa penambahan alfa-siklodekstrin didapatkan nilai sig $0,200 > 0,05$ dan plasma lipemik berat dengan penambahan alfa-siklodekstrin didapatkan nilai $0,123 > 0,05$ yang artinya data tersebut terdistribusi normal. Selanjutnya pengujian homogenitas data untuk mengetahui apakah data pada penelitian ini homogen atau tidak homogen.

Berdasarkan hasil uji homogenitas varian antar kelompok pemeriksaan PT, diperoleh nilai signifikan $0,014 < 0,05$ yang artinya varian antar kelompok pemeriksaan PT tidak homogen.

1) Uji Kruskal Wallis

Berdasarkan hasil uji Kruskal Wallis terhadap nilai pemeriksaan PT dengan seluruh perlakuan memiliki hasil $0,001 < 0,05$ maka terdapat perbedaan yang signifikan. Artinya terdapat pengaruh penambahan Alfa-siklodekstrin pada plasma lipemik terhadap pemeriksaan Prothrombin Time (PT) yang signifikan

2) Uji Mann Whitney

Berdasarkan uji Mann Whitney terhadap setiap variasi didapatkan nilai $0,001 < 0,05$, maka ada perbedaan yang signifikan. Artinya terdapat perbedaan yang signifikan pada setiap variasi.

5. KESIMPULAN

Dari hasil penelitian pengaruh penambahan alfa-siklodekstrin terhadap plasma lipemik pada pemeriksaan PT dengan sampel sebanyak 10 dilakukan secara duplo didapatkan hasil pada uji kruskal wallis pemeriksaan PT didapatkan nilai $0,005 < 0,001$, berarti terdapat perbedaan yang signifikan. Artinya penambahan alfa-siklodekstrin pada plasma lipemik terhadap pemeriksaan PT memperpanjang nilai PT secara signifikan.

Daftar Pustaka

- Asturi, D. (2018). Hemostatis. Pusat Pendidikan Sumberdaya Manusia Kesehatan. Jakarta: ECG. Bakta, I. (2006). Hematologi Klinik Ringkas. Jakarta: ECG.
- Calmarza P, & C. (2011). Lipemia in-terferences in routine clinical biochemi-cal tets. Spain: Biochem Med.
- Contois, J. (2013). Assay Interference: A Need for Increased Understanding and Testing. USA: Sun Diagnostics.
- Dalimartha, S. (2011). 36 Resep Tumbuhan Obat Untuk Menurunkan Kolesterol. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Duracim, A. (2018). Hemostatis. Pusat Pendidikan Sumberdaya Manusia Kesehatan. Jakarta.: ECG. H., Q. (2005). Production Cyclodextrin Complexes. US Patents, 6:884-885.
- Hidayat, A. (2014, Juli 16). Penjelasan dan Teori Uji Kruskal Wallis H. Retrieved from statistikian: <https://www.statistikian.com/2014/07/uji-kruskall-wallis-h.html>
- Laga, A. (2010). Produksi Siklodekstrin dari Substrat Tapioka dengan Menggunakan Pullulanase dan CGTase secara Simultan. Jurnal Teknologi Industri Pertanian, Volume 18 Nomor 2.
- Loftsson, T. M. (2005). Self-Association of Cylodextrin and Cyclodextrin Complexes . J. Pharm. Sci 93, (9):1091.
- Masruroh, A. (2014). Kolerasi Antara Kadar Trigliserida dengan Kadar Kolesterol Pada Serum Lipemik. Surabaya: Perpustakaan Universitas Muhammadiyah.
- Mutiasari, F. (2019). Pengaruh Variasi Tingkat Lipemik Terhadap Pemeriksaan Ptromboplastinn Time (PT). Bandung: Perpustakaan Sekolah Tinggi Analisis Bakti Asih .

Nikolac, N. (2013). *Lipemia : Causes, Interference Mechanisms, Detection and Management*. Croatia: Biochemia Medica.

Nopiasari, D. (2019.). *Perbedaan Kadar Trigliserida Pada Serum Lipemik Yang Diolah Dengan Alfa Siklodekstrin Dan High SpeedSentrifugasi*. Politeknik Kesehatan Yogyakarta: Skripsi Sarjana Terapan.

Nugraha, G. (2017). *Hematologi Dasar*. Jakarta: CV.TRANS INFO MEDIA.

Piyophipong, S. W. (Siniraj Medical Journal). *Factitious Result in Clinical Chemistry Test Caused by Common Endogenous Interferents*. 2010 , volume 62 Number 4.

Prince, S. &. (2005). *Patofisiologi klinik proses- proses penyakit vol 1*. Jakarta: EGC.

R, I. d. (2018). *Variasi Konsentrasi Alfa Siklodekstrin dan Waktu Sentrifugasi Dalam Preparasi Serum Lipemik Pada Pemeriksaan Glukosa Metode GOD- PAP*. *Jurnal Teknologi Laboratorium*, Vol.7, No.1, Maret 2018, pp. 31 - 37.

Rahajuningsih, D. (2009). *Hemostasis Dan Trombosis*. Jakarta: Balai Penerbit FKUI.

Riswanto. (2013). *Pemeriksaan Laboratorium Hematologi*. Yogyakarta: Kanal Medika.

Riyani. (2018). *Jurnal Penuntun Praktikum Kimia Klinik II*. Bandung: Perpustakaan Sekolah Tinggi Analisis Bakti Asih.

Sacher R, &. M. (2004). *Tinjauan Klinis Hasil Pemeriksaan Laboratorium*. Jakarta: EGC.

Sofro, A. (2012). *Darah*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.

Utama, H. (2007). *Hemostasis dan Trombosis Edisi Ketiga*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Wowor FJ, T. S. (2013). *Perbandingan Kadar Trigliserida Darah Pada Pria Perokok dan Bukan Perokok*. *Jurnal e-Biomedik (eBM)* , Volume 1 Nomor 2 Juli 2013 986-990.