

AKTIVITAS ANTIFUNGAL MINYAK ATSIRI JINTEN PUTIH TERHADAP *Candida parapsilosis* SS25, *C. orthopsilosis* NN14, *C. metapsilosis* MP27, DAN *C. etchellsii* MP18

Ridawati^{1,2*}, Betty Sri Laksmi Jenie¹, Ita Djuwita³, dan Wellyzar Sjamsuridzal⁴

1. Departemen Ilmu Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB, Bogor 16680, Indonesia
2. Fakultas Teknik, Program Studi Tata Boga IKK, Universitas Negeri Jakarta, Jakarta 13220, Indonesia
3. Departemen Anatomi Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, IPB, Bogor 16680, Indonesia
4. Departemen Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Indonesia, Depok 16424, Indonesia

^{*}E-mail: ridawatis@yahoo.co.id

Abstrak

Salah satu rempah-rempah di Indonesia yang digunakan sebagai bumbu dan juga sebagai obat tradisional adalah biji jinten putih (*Cuminum cyminum*) yang mengandung minyak atsiri (*Cumin oil*) dan telah dilaporkan memiliki sifat antimikroba. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antifungal minyak atsiri biji jinten putih terhadap empat spesies khamir hasil isolasi dari produk pangan dan diidentifikasi pada daerah ITS yaitu *Candida parapsilosis* SS25, *C. orthopsilosis* NN14, *C. metapsilosis* MP27, *C. etchellsii* MP18. Pengujian aktivitas antifungal dilakukan menggunakan metode difusi medium padat dengan cakram dan metode kontak langsung, nistatin digunakan sebagai kontrol positif. Minyak atsiri yang diperoleh dari distilasi uap biji jinten putih memiliki rendemen 2,5-3,0%, tidak berwarna atau berwarna kuning muda. Hasil analisis GC-MS dari minyak atsiri jinten putih menunjukkan 12 puncak yang terdiri dari benzaldehida/kuminaldehida (35,44%), ρ -simen (34,77%), β -pinen (15,08%), γ -terpinen (8,15%). Beberapa monoterpen lainnya terdeteksi sebagai α -thujen/ α -pelandren, α -pinen, trans-limonen, cis-limonen, dan senyawa golongan alkena seperti pentilsikloheksena dan sikloheksena serta eter (apiol). Hasil pengamatan uji antifungal menunjukkan bahwa seluruh khamir uji memberikan respon sensitif terhadap minyak atsiri jinten putih dengan radius zona hambat 13,4-16,5 mm. Minyak atsiri jinten putih dapat menghambat pertumbuhan khamir uji dengan nilai MIC 0,028-0,042% dan nilai MFC 0,09%-0,14%. Minyak atsiri jinten putih memiliki aktivitas antifungal yang sangat kuat dibandingkan dengan nistatin, nilai MIC dan MFC nistatin yaitu 0,40-0,50% dan 3,0-4,0%.

Abstract

Antifungal Activity of Cumin Oil Against *Candida parapsilosis* SS25, *C. orthopsilosis* NN14, *C. metapsilosis* MP27, and *C. etchellsii* MP18. Many kinds of spices are used in Indonesia, one of them is white cumin seed. This spice is used not only for cooking, but also for traditional medicine. This study reported of antifungal activity from white cumin's essential oil. Extraction and identification of Cumin oil were carried out. We obtained 2.5-3.0% of white essential oil which was colorless or light yellow color. GCMS analysis revealed that there were 12 peaks. Based on peak's intensity the oil were dominated by 4 compound i.e. cuminaldehyde (35.44%), ρ -cymene (34.77%), β -pynene (15.08 %) and γ -terpinene (8.15%). Growth inhibition zone determination has been carried out by diffusion disc and direct method against yeast i.e. *C. parapsilosis* SS25, *C. orthopsilosis* NN14, *C. metapsilosis* MP27, and *C. etchellsii* MP18. The results showed that all of the yeasts were sensitive to cumin oil. The inhibition zone radius were 13.4-16.5 mm. The cumin oil showed the inhibition of yeast growth with MIC values of 0.028%-0.042% and MFC values 0.09%-0.14%, while nystatin had MIC values 0.40%-0.50% and MFC values 3.0%-4.0%. The activity of cumin oil was very strong as antifungal.

Keywords: antifungal, *Candida*, cumin oil, *Cuminum cyminum*, nystatin

1. Pendahuluan

Spesies *Candida* merupakan salah satu spesies khamir yang sering menyebabkan infeksi. *Candida* adalah anggota flora normal terutama saluran pencernaan,

selaput mukosa, saluran pernafasan, vagina, uretra, kulit, di bawah kuku tangan dan kaki. *Candida* merupakan salah satu khamir yang bersifat oportunistik. Penyakit yang disebabkan oleh *Candida* dapat menyerang mulut, vagina, kulit, kuku dan paru, kadang-

kadang dapat menyebabkan septikemia, endokarditis atau meningitis. Disamping penyebab penyakit, beberapa peneliti melaporkan ditemukannya genus ini sebagai kontaminan bahan pangan [1-3]. Spesies *Candida* seperti *C. parapsilosis* SS25, *C. orthopsilosis* NN14, *C. metapsilosis* MP27, *C. etchellsii* MP18 berhasil diisolasi dan diidentifikasi dari produk pangan lokal bergula tinggi di Indonesia [4]. Beberapa dari khamir tersebut diduga merupakan khamir yang resisten terhadap pengawet sintetik seperti asam benzoat dan garam benzoat.

Penggunaan senyawa antifungal dari kelompok poliena seperti nistatin, amfoterisin, natamisin, kelompok imidazol dan triazol, telah banyak digunakan dalam dunia medis untuk pengobatan infeksi akibat khamir. Meningkatnya khamir-khamir yang memiliki resistensi terhadap senyawa antifungal yang ada, mendorong peneliti terus melakukan eksplorasi senyawa baru yang memiliki sifat antifungal. Selain itu, efek samping yang ditimbulkan akibat penggunaan pengawet sintetik atau obat antibiotik, menyebabkan masyarakat tetap mengharapkan bahan-bahan alami yang dapat digunakan sebagai alternatif bahan pengawet alami dan pengobatan.

Berbagai jenis tanaman telah digunakan sebagai senyawa pemberi citarasa dan memiliki aktivitas antifungal. Senyawa bioaktif tanaman yang bersifat antifungal umumnya adalah minyak atsiri, senyawa aldehida dan senyawa fenol [5-8]. Minyak atsiri tanaman terdiri dari senyawa monoterpen dan sesquiterpen dengan hidrokarbon sebagai rumus umumnya (C_5H_8)_n. Turunan senyawa teroksidasi dari hidrokarbon ini adalah alkohol, aldehida, ester, eter, senyawa keton, fenol dan oksida [5,9].

Biji jinten putih merupakan salah satu rempah yang banyak digunakan sebagai bumbu masakan dan campuran dalam obat-obatan tradisional. Kandungan minyak atsiri biji jinten putih dilaporkan memiliki kemampuan sebagai senyawa antimikroba terhadap bakteri patogen penyebab kerusakan tanaman [10] dan terhadap bakteri *B. subtilis*, *Staphylococcus epidermidis* serta khamir *Sacharomyces cerevisiae* dan *Candida albicans* [8]. Tetapi kemampuan antifungal minyak atsiri biji jinten putih terhadap khamir yang tahan pengawet sintetik belum pernah dilaporkan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antifungal minyak atsiri biji jinten putih terhadap khamir yang tahan pengawet sintetik terutama pada bahan pangan bergula tinggi.

2. Metode Penelitian

Ekstraksi minyak atsiri jinten putih. Biji jinten putih yang diperoleh dari pasar induk Kramat Jati, Jakarta diekstrak dengan menggunakan distilasi uap selama 4

jam. Minyak atsiri yang diperoleh dibebaskan dari air dengan menggunakan $MgSO_4$ anhidrat dan selanjutnya disimpan dalam botol gelap pada suhu 4 °C sebelum digunakan.

Analisis komponen minyak atsiri jinten putih. Sebanyak 1 µl sampel minyak atsiri jinten putih digunakan untuk analisis komponen dengan GCMS. Identifikasi dan konfirmasi identitas komponen volatil dilakukan dengan bantuan komputer untuk membandingkan spektra massa suatu senyawa dengan *mass spectra library* koleksi NIST (National Institute of Standard and Technology) USA. Kondisi GC: kolom kapiler DB-5MS (dimensi 30 m x 0,32 mm x 0,25 µm), laju alir 1.0 mL/menit, injeksi split, gas pembawa Helium 80 kPa, suhu *injector* 250 °C, suhu *interface* 280 °C, suhu program 60 °C selama 5 menit hingga 300 °C selama 2 menit (laju kenaikan 10 °C/min). Kondisi MS: Energi ionisasi 1,5 kV, kisaran berat molekul 40-550 Da.

Khamir uji. Khamir uji adalah khamir hasil isolasi dan identifikasi pada daerah ITS dari produk pangan lokal bergula tinggi yaitu *C. parapsilosis* SS25, *C. orthopsilosis* NN14, *C. metapsilosis* MP27, *C. etchellsii* MP18 [4]. Pemeliharaan khamir menggunakan medium Potato Dextrose Agar (PDA) dengan 50% sukrosa.

Pengujian aktivitas antifungal dan penentuan minimum inhibitory concentration (MIC) serta minimum fungicidal concentration (MFC) minyak atsiri jinten putih. Teknik difusi medium padat dengan cakram digunakan untuk pengujian aktivitas antifungal [11,12]. Radius penghambatan diukur dan nilainya sama dengan atau lebih besar dari 10 mm maka senyawa tersebut memiliki aktivitas antifungal, pengujian dilakukan triplo. Penentuan nilai MIC dilakukan berdasarkan metode kontak langsung minyak atsiri dengan sel khamir uji di dalam medium. Nilai MIC merupakan konsentrasi terendah dari minyak atsiri jinten putih yang dapat menghambat pertumbuhan (fungistatik) setiap khamir uji di dalam medium pertumbuhan. Sebanyak 100 mL medium cair steril (PDB) dengan sukrosa 50% di dalam erlenmeyer 250 mL ditambahkan dengan minyak atsiri jinten putih sejumlah (0,01% v/v-0,10% v/v). Selanjutnya diinokulasikan 1 mL kultur kerja khamir 10^6 CFU/mL, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 5 hari pada inkubator goyang dengan kecepatan 150 rpm. Pengamatan dilakukan dengan melihat ada tidaknya pertumbuhan pada medium. Medium dengan konsentrasi minyak atsiri terendah yang tidak memperlihatkan adanya pertumbuhan merupakan nilai MIC dari minyak atsiri tersebut. Penentuan nilai MIC selanjutnya diulang dengan menggunakan rentang nilai konsentrasi yang lebih kecil (0,020% v/v-0,05% v/v) dengan interval 0,002%. Penentuan MFC dilakukan dengan memindahkan 300 µL medium dari erlenmeyer

yang berisi sel khamir uji yang telah dikontakkan dengan minyak atsiri jinten putih dan diinkubasi selama 5 hari tetapi tidak menunjukkan adanya pertumbuhan, ke dalam medium pemulihan dan diinkubasi selama 5 hari pada suhu 37 °C. Konsentrasi minyak atsiri terkecil yang tetap tidak menunjukkan adanya pertumbuhan ditetapkan sebagai MFC [7]. Kontrol positif yang digunakan adalah nistatin.

3. Hasil dan Pembahasan

Hasil ekstraksi yang diperoleh berupa minyak atsiri dengan rendemen 2,5-3,0% minyak volatil yang tidak berwarna atau berwarna kuning muda. Sifat antimikroba minyak atsiri sudah diketahui sejak lama [8]. Aktivitas antimikroba minyak atsiri juga dipengaruhi oleh komponen utama yang terdapat dalam minyak atsiri. Minyak atsiri memiliki kemampuan sebagai antimikroba tergantung pada konsentrasi dan komposisi kimia dari minyak tersebut (Tabel 1).

Waktu retensi keluarnya komponen volatil minyak atsiri biji jinten putih ditunjukkan dengan munculnya puncak pertama kali setelah 4,5 menit, selanjutnya disusul oleh puncak kedua pada menit ke 4,7 dan seterusnya hingga puncak yang sama. Puncak ketiga, keempat kelima dan puncak ke sepuluh yang muncul berturut-turut setelah waktu retensi 5,6 menit, 6,8 menit, 7,2 menit, 10,9

menit merupakan komponen mayor yang dihasilkan, sedangkan puncak yang lainnya merupakan komponen minor dari minyak atsiri biji jinten putih.

Senyawa yang mendominasi minyak atsiri biji jinten putih adalah benzaldehida/kumin aldehida dari golongan aldehida (35,44%), ρ -simen (34,77%), β -pinen (15,08%) dan γ -terpinen (8,15%) adalah monoterpen yang teridentifikasi pada minyak atsiri biji jinten putih. Beberapa monoterpen lainnya berhasil diidentifikasi seperti α -thujen/ α -pelandren, α -pinen, trans-limonen, cis-limonen, dan senyawa golongan alkena seperti pentilsikloheksena dan sikloheksena serta eter (Tabel 1).

Pengujian aktivitas antifungal minyak atsiri biji jinten putih diawali dengan uji pendahuluan untuk mengetahui kemampuan minyak atsiri dalam menghambat pertumbuhan *C. parapsilosis* SS25, *C. orthopilososis* NN14, *C. metapsilosis* MP27, *C. etchellsii* MP18.

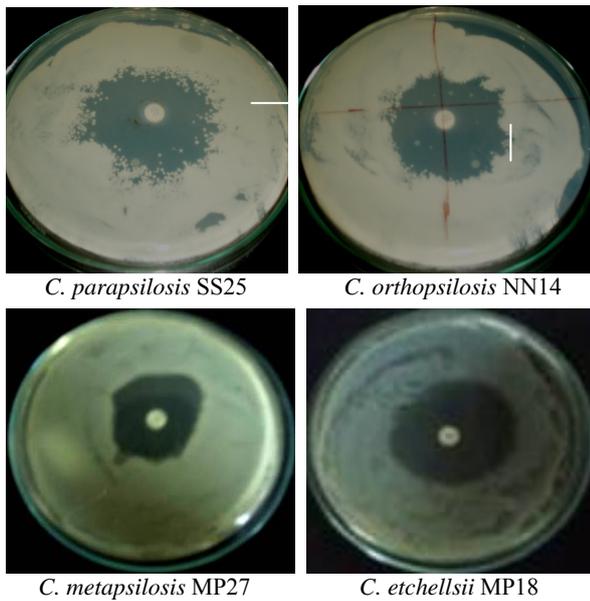
Empat spesies khamir uji memberikan respon sensitif terhadap minyak atsiri biji jinten putih, yang ditunjukkan oleh area bening disekeliling cakram yang menandakan tidak ada khamir yang tumbuh. Radius zona hambat antara 13,4-16,5 mm (Gambar 1). Semakin luas areal bening yang terbentuk disekitar cakram menunjukkan semakin kuat aktivitas antifungal dari senyawa uji [11].

Tabel 1. Hasil Identifikasi Komponen Minyak Atsiri Biji Jinten Putih Menggunakan GCMS

Komponen	Golongan	MR	Rumus Molekul	Waktu Retensi (menit)	% Relatif
α -thujen/ α -pelandren	monoterpen	136	C ₁₀ H ₁₆	4,576	0,26
α -pinen	monoterpen	136	C ₁₀ H ₁₆	4,728	1,58
β -pinen	monoterpen	136	C ₁₀ H ₁₆	5,629	15,08
ρ -simen	monoterpen	136	C ₁₀ H ₁₄	6,821	34,77
γ -terpinen	monoterpen	136	C ₁₀ H ₁₆	7,213	8,15
trans-limonen	monoterpen	152	C ₁₀ H ₁₆ O	8,511	0,34
cis-limonen	monoterpen	152	C ₁₀ H ₁₆ O	8,953	0,50
pentilsikloheksena	alkena	152	C ₁₁ H ₂₀	9,069	1,06
cis dihidrokarvon	monoterpen	152	C ₁₀ H ₁₆ O	9,653	0,27
benzaldehyd/kumin aldehid	aldehid	152	C ₁₀ H ₁₂ O	10,930	35,44
Sikloheksena	alkena	150	C ₁₀ H ₁₆ O	11,333	1,92
Eter (Apiol)	eter	222	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	15,986	0,64

Tabel 2. Nilai MIC dan MFC Minyak Atsiri Biji Jinten Putih dan Nistatin

Jenis Khamir Uji	Minyak Atsiri Jinten Putih		Nistatin	
	MIC % (v/v)	MFC % (v/v)	MIC% (w/v)	MFC % (w/v)
<i>C. parapsilosis</i>	0,040	0,13	0,5	4,0
<i>C. metapsilosis</i>	0,036	0,14	0,5	4,0
<i>C. orthopilososis</i>	0,042	0,14	0,5	4,0
<i>C. etchellsii</i>	0,040	0,12	0,4	3,0



Gambar 1. Diameter Penghambatan Minyak Atsiri Jinten Putih terhadap Khamir Uji

Minyak atsiri biji jinten putih dapat menghambat pertumbuhan keempat khamir uji dengan nilai MIC 0,036-0,042%, sedangkan standar antifungal yang digunakan (nistatin) memiliki nilai MIC 0,40-0,50% (Tabel 2). Nilai MFC dari minyak atsiri biji jinten putih terhadap khamir uji berkisar antara 0,12%-0,14%, sedangkan nistatin memiliki nilai MFC 3,0-4,0%. Hal tersebut menunjukkan bahwa aktivitas minyak atsiri biji jinten putih sangat kuat sebagai antifungal ($p < 0,05$).

Nistatin merupakan antifungal dari golongan poliena yang aman terhadap sel mamalia [13]. Nistatin merupakan antifungi golongan poliena yang bekerja mengikat sterol (terutama ergosterol) pada membran sel fungi. Beberapa penelitian melaporkan ergosterol berkompetisi dengan kolesterol dan menjadi target kerja dari antifungal nistatin [14-15]. Nistatin merupakan antifungi yang efektif bekerja pada khamir jenis *candida* [16], sehingga nistatin sering digunakan sebagai kontrol positif senyawa antifungal.

Penelitian ini menunjukkan bahwa minyak atsiri biji jinten putih dapat menghambat pertumbuhan khamir yang tahan terhadap pengawet sintetik yang hidup pada bahan pangan bergula tinggi. Minyak atsiri biji jinten putih yang mengandung senyawa dominan dari golongan monoterpen dan aldehida memiliki kemampuan yang lebih tinggi dibandingkan nistatin (Tabel 1 dan Tabel 2). Minyak atsiri jinten putih didominasi oleh senyawa kuminaldehida, ρ -simen, β -pinen dan γ -terpinen. Senyawa fitokimia seperti α -pinen, β -pinen, sitral dan eugenol dilaporkan memiliki aktivitas penghambatan terhadap beberapa strain khamir

patogen penyebab penyakit seperti *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. stellatoidea*, *C. crusei*, *C. parapsilosis*, dan *C. criptococcus neoformans* [11].

Peneliti lainnya melaporkan kemampuan minyak atsiri rempah sebagai antifungal. Minyak atsiri kulit kayu manis (*Cinnamomum burmani*) dilaporkan efektif menghambat pertumbuhan khamir *C. albicans* dengan nilai MIC 1% (v/v) dan nilai MIC 1 mL minyak atsiri kayu manis dilaporkan sebanding dengan 549 mg nistatin [17]. Kemampuan antifungal senyawa flavonoid hasil ekstrak dari propolis dilaporkan efektif terhadap isolat *C. parapsilosis* yang resisten terhadap nistatin dengan nilai MIC 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (dengan kandungan senyawa flavonoid 393 $\mu\text{g/mL}$) [18].

Hasil analisis komponen volatil minyak atsiri biji jinten putih sejalan dengan hasil yang dilaporkan oleh peneliti lainnya tentang komponen utama minyak atsiri biji jinten putih yaitu golongan aldehida dan monoterpen. Komponen utama minyak atsiri dari jinten putih (*Cuminum cyminum*) adalah p-mentha-1,4-dien-7-al, kumin aldehida, γ -terpinen dan β -pinen [10], sedangkan minyak atsiri yang diekstrak dari biji jinten putih dengan cara hidrodistilasi diketahui terdiri dari minyak kuminal (36,31%), kuminik alkohol (16,92%), terpinen (11,14%), safranil (10,87%), p-simen (9,85%) dan β -pinen (7,75%) [19]. Kandungan minyak atsiri biji jinten putih dari Bulgaria yang telah disimpan selama 36 tahun terdiri dari 36% kuminaldehida, 19,3% β -pinen, 18,4% α -pinen dan 15,3% γ -pinen [8].

Selain memiliki komponen molekul hidrofobik, minyak atsiri jinten putih juga mengandung senyawa hidrokarbon yang mengandung gugus fungsi aldehida dalam persentase yang cukup besar yaitu kuminaldehida yang bersifat hidrofilik, sehingga kemampuannya menghambat fungsi secara keseluruhan menjadi lebih efektif.

Molekul hidrofobik penyusun minyak atsiri dapat menyebabkan perubahan permeabilitas membran dan kerusakan membran yang akhirnya menyebabkan kematian sel. Molekul minyak atsiri juga dapat mengganggu kerja enzim-enzim yang terikat pada membran sel khamir, sehingga mengganggu aktivitas kerja pada membran sel [7,20]. Senyawa bisiklik seskuiterpen dialdehida dilaporkan memiliki kemampuan mengubah fungsi membran dari protein integral sebagai senyawa aktif permukaan nonionik (surfaktan) dan membentuk derivatif pirol dengan kelompok amina primer fosfatidil etanol amin dan fosfatidilserin di lapisan luar membran plasma yang mengganggu kerja membran plasma, masuk ke dalam sitoplasma dan bereaksi dengan L-sistein yang terdapat didalam sitoplasma seperti pada glutation, protein dan alkohol dehidrogenase [21].

4. Simpulan

Hasil analisis GCMS menunjukkan bahwa minyak atsiri biji jinten putih terdiri atas senyawa monoterpen dan aldehida. Minyak atsiri biji jinten putih memiliki potensi antifungal yang kuat dalam menghambat pertumbuhan khamir yang tahan pengawet sintetis dan hidup pada bahan pangan bergula tinggi. Oleh karena itu minyak atsiri biji jinten putih dapat dijadikan antifungal alami sebagai pengganti pengawet sintetis.

Daftar Acuan

- [1] J.A. Barnet, R.W. Payne, D. Yarrow, *Yeast: Characteristics and Identification* (ed), Cambridge University Press, England, 2000, p.1139.
- [2] T. Deak, *Detection, Enumeration and Isolation of Yeast*, In: T. Boekhout, V. Robert, *Yeast in Food: Beneficial and Detrimental Aspects*, CRC Press, Cambridge, England, 2003, p.39.
- [3] S.G. Deans, G. Ritchie, *Int. J. Food Microbiol.* 5 (1987) 165.
- [4] Ridawati, B.S.L. Jenie, I. Djuwita, W. Sjamsuridzal, *Microbiol Indones.* 4/3 (2010) 113.
- [5] H.J.D. Dorman, S.G. Deans, C. Figueiredo, J.G. Barroso, G.J. Ruberto. *Flav. Fragr. J.* 3 (1998) 235.
- [6] J.W. Kim, Y.S. Kim, K.H. Kyung. *J. Food Prot.* 67 (2004) 499.
- [7] I. Kubo, K.I. Fujita, A. Kubo, K.I. Nihei, S.L. Christopher, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 3951.
- [8] J. Leopold, B. Gerhard, S.S. Albena, G.V. Evgenii, D.T. Stanka, *Int. J. Food. Sci. Technol.* 40/3 (2005) 305.
- [9] M.T. Baratta, H.J.D. Dorman, S.G. Deans, C. Figueiredo, J.G. Barroso, G. Ruberto. *J. Flav. Fragr.* 13 (1998) 235.
- [10] N.S. Iacobellis, P.L. Cantore, F. Capasso, F. Senatore, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 57.
- [11] I.O. Lima, R.D.A.G. Oliveira, E.D.O. Lima, E.L.D. Souza, N.P. Farias, D.D.F. Navarro, *Braz. J. of Pharm Sci.* 41 (2005) 2.
- [12] C.A.M.J. Sousa, M.F. Ferreira, C. Leao, *J. Food Protect.* 66/4 (2003) 625.
- [13] J.H. Doughari, S.P. Nuya, *Pak. J. Med. Sci.* 24/1 (2008) 91.
- [14] L. Silva, A. Coutinho, A. Fedorov, M. Prieto. *Biophysic J.* 90/10 (2006) 3625.
- [15] A. Coutinho, L. Silva, A. Fedorov, M. Prieto. *J. Biophysic* 87/5 (2004) 3264.
- [16] S. Normand, B. Francois, M. Bonnivard, H. Gastinne, P. Vignon, *Intensive Care Med.* 31 (2005) 1508.
- [17] E.Y. Sukandar, A.G. Sukanda, Muslikhati, *Farmasi Indonesia* 10/1 (1999) 31.
- [18] F.D.D. Kelen, G.I.F. Maria, L.B. Marcos, M.P. Sandra, E.L.C. Marcia, I.E.S. Terezinha, *J. Alt. Comp. Med.* 16/3 (2010) 285.
- [19] L. Rong, Z. Jiang, *J. Flav. Fragr.* 19/4 (2004) 311.
- [20] I. Kubo, I.K. Hori, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 4574.
- [21] I. Fujita, I. Kubo, *J. Agric Food Chem.* 53 (2005) 5187.