



Formulasi dan Evaluasi Sediaan Suspensi Submikro Kitosan-Alginat Penenkapsulasi Ekstrak Buah Pare (*Momordica charantia* Linn.) Dengan Stabilizer Kalsium Klorida

*Formulation and Evaluation of Submicron Suspension of Chitosan-Alginate
Encapsulating Pare Fruit Extract (Momordica charantia Linn.) Using Calcium
Chloride As Stabilizer*

Mardiyanto^{1,*}, Indah Solihah¹, Qodaruddin¹

¹Universitas Sriwijaya, Palembang

Corresponding author: mardiyanto@mipa.unsri.ac.id

Abstrak

Buah pare (*Momordica charantia*) memiliki kelompok zat berkhasiat obat seperti alkaloid, aglikon-flavonoid, triterpenoid dan saponin. Penelitian ini bertujuan untuk memformulasi submikropartikel ekstrak buah pare dengan cara penyalutan menggunakan polimer kitosan dan natrium alginate. Pembuatan biopolimerik-partikel ini melibatkan interaksi kitosan-alginat dan didalamnya terdapat ekstrak. Formasi diperkuat dengan variasi stabilizer CaCl₂ 20µL, 40µL dan 100µL. Masing-masing formula menunjukkan hasil %EE berturut-turut 88,875±0,121%, 91,183±0,106%, dan 87,363±0,092%. Hasil penentuan properti fisika dari formula optimum meliputi ukuran dan distribusi partikel (*Poly Dispersity Index/PDI*), serta zeta potensial dilakukan dengan alat *particle size analyzer* (PSA) dan hasilnya berturut-turut adalah 931,3 nm; 0,328; dan +25,6 mV. Selanjutnya penentuan stabilitas terhadap sediaan submikro partikel pengenkapsulasi ekstrak dicobakan dengan metode *heating cooling cycle* dengan variasi pH 2,0; 5,5; dan 7,4. Pengujian yang dilakukan pada pH 5,5 dan 7,4 menunjukkan kestabilan sedangkan pada pH 2,0 menunjukkan penurunan kadar flavonoid didalam ekstrak yang terenkapsulasi.

Kata kunci: *Momordica*, formulasi, karakterisasi, submikro-partikel, gelasi-ionik

Abstract

Bitter melon (Momordica charantia) has a group of medicinal substances such as alkaloids, aglycone-flavonoids, triterpenoids and saponins. This study aims to formulate submicroparticles of bitter melon extract by coating using biopolymer of chitosan and sodium alginate. The preparation of this biopolymeric particle was involved chitosan-alginate interaction loading the extract. The formation was strengthened with variations of stabilizer CaCl₂ 20µL, 40µL and 100µL. Each formula showed %EE results respectively 88.875±0.121%, 91.183±0.106%, and 87.363±0.092%. The results of determining the physical properties of the optimum formula (F2) including particle size and distribution (Poly Dispersity Index/PDI), as well as zeta potential using a particle size analyzer (PSA) were 931.3 nm; 0.328; and +25.6 mV respectively. Furthermore, the determination of the stability of submicro particle loading the extract was evaluated by the heating cooling cycle method with a variation of pH 2.0; 5.5; and 7.4. Tests carried out at pH 5.5 and 7.4 showed the stability while at pH 2.0 showed a decrease in flavonoid levels in the encapsulated extract.

Keywords: *Momordica*, formulation, characterization, submicro-particles, gelation-ionic

PENDAHULUAN

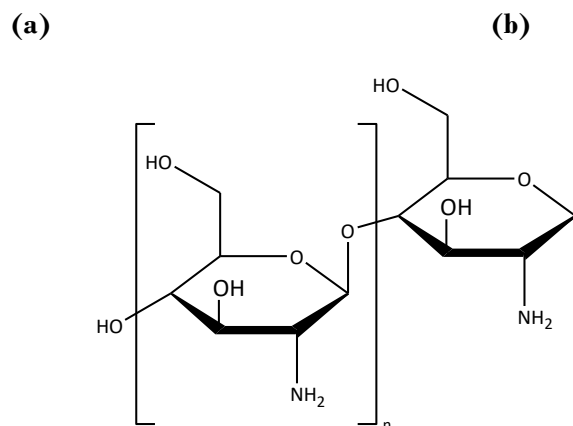
Pare mempunyai manfaat sebagai bahan obat alam yang dapat digunakan untuk mencegah kanker, mencegah DM, mencegah reaksi oksidasi yang berlebihan, dan penghambat pertumbuhan kuman. Manfaat ini disebabkan oleh adanya zat aktif (*active secondary-metabolite*) yang terdapat dalam buah pare contohnya kelompok flavon, steroid-terpenoid, *saponine*, dan *tanine*. Komposisi metabolit sekunder dari buah pare yang berkhasiat untuk pengobatan adalah sebagai berikut: flavonoid 27,34%, tannin 2,02%, saponin 12,12%, alkaloid 31%, triterpenoid atau steroid 6% (Coutinho *et al.*, 2009).

Kelompok mikroba seperti fungi dan bakteri, menjadi pemicu utama terhadap kejadian rusaknya membran kulit manusia. Kerusakan ini disebabkan adanya aktivitas selulolitik mikroba (Gunasekaran *et al.*, 2014). Fungi menjalankan peran dalam *biodeterioration* (pemburukan) penyakit yang terdapat pada kulit dan jaringan lainnya pada tubuh manusia. *Biodeterioration* penyakit dikarenakan fungi dermatofita dalam keluarga arthrodermataceae dengan lebih dari 40 spesies yang salah satu genusnya adalah jamur *Trichophyton* (Shin *et al.*, 2008). Ekstrak tumbuhan umumnya dapat rusak pada udara terbuka termasuk ekstrak buah pare (Wu *et al.*, 2008) karena uap air dan oksigen di udara dapat memicu reaksi oksidasi dan pertumbuhan mikroba pada ekstrak pada suatu kurun waktu.

Pada perencanaan suatu formula sediaan partikulat diantaranya menggunakan biopolimer kitosan-alginat sudah sering dilakukan pada penelitian untuk melindungi ekstrak (Honarkar, 2009) dan (Gupta, 2011). Formulasi partikel difasilitasi oleh adanya reaksi polionik serta penstabilan oleh kation kalsium menghasilkan partikel dengan ikatan saling sambung silang (Mardiyanto, 2013). Review dari kelompok penelitian Allen pada tahun 2011, mengindikasikan enkapsulasi double kitosan-alginat berhasil mengurangi porositas berukuran besar.

Dari informasi dan data-data yang telah diterangkan ini, maka pada kesempatan ini peneliti mencoba suatu proses penyiapan partikel dan penentuan property fisik partikel kitosan-alginat terhadap enkapsulasi ekstrak etanol dari buah pare. Karakterisasi yang dilakukan berupa penentuan morfologi, ukuran dan distribusi partikel, penetapan zeta potensial, dan penetapan %EE.





Gambar 1: Buah Pare dan struktur kimia kitosan

METODE

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini berupa polimer dengan kualitas aman untuk manusia dan pelarut organik dengan kualitas untuk analisis: yaitu buah pare muda diperoleh dari daerah Banyu Asin. Ketokonazol, polimer kitosan dan natrium alginat dari Sigma-Aldrich[®], *acetic-acid*, *cation calsium*, etanol 96%, natrium klorida, *sodium biphospic*, *sodium phospic*, dan *sodium hydroxide* dari Merck[®].

Pembuatan Ekstrak

Pertama-tama dilakukan persiapan pembuatan ekstrak berupa membersihkan buah pare, memotong, dan menjemur buah pare terlindung dari cahaya matahari. Selanjutnya proses ekstraksi dengan merendam 1 kg buah pare pada 2,5 L etanol 96%. Proses dilakukan pada ruangan terlindung matahari sambil diaduk selama 5 hari. Hasil penyarian lalu dipekatkan dengan *system vacuum* Buchi-10D-200[®].

Karakterisasi Ekstrak

Penentuan alkaloid adalah dengan menggunakan reagen umum penampak noda alkaloid. Sebanyak 0,5 g ekstrak dimasukkan ke dalam 1 mL HCl 2M dan 9 mL air suling di atas *hotplate* 2 menit, tabung diangkat dan dibiarkan 15 menit hingga dingin dan selanjutnya dilakukan filtrasi. Hasil penyaringan dibagi menjadi tiga kelompok dengan penambahan reagen Mayer, Wagner, dan Dragendorff. Adanya endapan menunjukkan bahwa pada sampel terdapat alkaloid. Warna endapan juga diperhatikan yang spesifik untuk untuk setiap reagen (Chang, 2002).

Pemastian jenis yang pertama terhadap zat flavonoid dilakukan dengan menggunakan reagen Shinoda (logam Mg + HCl). Ekstrak sebanyak 0,5 g dimasukkan ke dalam 5 mL etanol pada tabung di atas *hotplate*. Kemudian difiltrasi dan hasil



saringannya ditetesi dengan HCl pekat dan 0,2 mg bubuk magnesium. Dokumentasi pengamatan dengan adanya perubahan warna. Cara selanjutnya uji penentuan flavonoid adalah pada larutan NaOH 10%. Sebanyak 0,5 mg ekstrak dimasukkan ke dalam 5 mL etanol pada tabung di atas *hotplate*. Setelah dingin ditetesi dengan NaOH 10%. Pendokumentasian hasil ditunjukkan dengan adanya perubahan warna.

Uji kualitatif terpenoid dan steroid dilaksanakan dengan malarutkan sampel pada 0,5 mL kloroform, kemudian ditetesi dengan 0,5 mL anhidra asetat serta 2 mL H₂SO₄ pada tabung uji. Dokumentasi hasil ditunjukkan dengan munculnya cincin berwarna pada perbatasan larutan uji.

Uji Flavonoid Menggunakan KLT

Sampel dan standar (kuersetin) dimasukkan ke dalam etanol 96%, kemudian ditetaskan pada permukaan plat kromatografi. Pada uji ini, sebagai fase diam adalah silika gel dan fase geraknya berupa campuran n-heksan-etil-asetat 3:4. Bercak KLT yang didokumentasi adalah warna yang muncul setelah dikontakkan dengan penampak noda. Pengamatan diperjelas dengan sinar ultraviolet pada Panjang gelombang 254 nm dan 366 nm (Gupta dkk., 2011).

Uji Alkaloid Menggunakan KLT

Sampel yang sudah dilarutkan dalam etanol ditetesi pada lempeng KLT dengan penandaan atas dan bawah. Kemudian noda dikembangkan dengan fase gerak berupa campuran methanol-kloroform (dengan perbandingan 8:5). Dokumentasi hasil berupa bercak yang berfluoresen pada lampu UV dengan panjang gelombang 254 dan 366 nm setelah dikontakkan dengan zat penampak bercak.

Penentuan Kadar Flavonoid Total

Pertama-tama dibuat kurva kalibrasi dengan memplotkan serial konsentrasi standar kuersetin dengan absorbansi dari spectrometer UV pada lamda 455 nm. (Chang *et al.*, 2002). Penetapan kadar flavonoid juga dilakukan untuk menentukan %EE. Standar dilarutkan dalam etanol *pa* demikian juga halnya dengan ekstrak. Pengukuran dilakukan secara triplo. Hasil yang didapat dibuat kurva kalibrasi dengan melihat ketidakadaan bias dari absorban sesuai hukum laber-beer dengan rentang absorbansi 0,2 hingga 0,8.

Formula

Particulate sub-micro formulation dari kitosan-alginat pengenkapsulasi ekstrak buah pare ditunjukkan pada Tabel 1. Pada penelitian ini ada tiga formula yaitu F1, F2, dan F3 berdasarkan beberapa penelitian yang mencoba formulasi partikel dengan material kitosan dan alginat (Coutinho,2009; Mardiyanto,2013). Formula (F1 hingga



F3) ditambahkan ekstrak buah pare sejumlah 50 mg berdasar khasiat antimikroba yang dimiliki.

Tabel 1.

Komposisi bahan pembentuk submikro partikel ekstrak pare

Nama Zat	Komposisi		
	F(1)	F(2)	F(3)
Buah pare (Ekstrak)	50 mg	50 mg	50 mg
<i>Chitosan</i>	12 mg	12 mg	12 mg
<i>Sodium alginate</i>	3,2 mg	3,2 mg	3,2 mg
<i>Calcium Chloride</i> 0,018 mM	20 μ L	40 μ L	100 μ L

Pembuatan Submikro Partikel Kitosan Pembawa Ekstrak Buah Pare

Ekstrak pare dikontakkan kepada misel kitosan 10 mL pada sebuah tabung pada sebuah *plate* dengan agitasi 750 rpm. untuk setiap formula dengan penandaan massa 1 (Luo *et al.*, 2012). misel alginat dipreparasi pada sebuah tabung di atas *plate* dengan agitasi 750 rpm untuk massa 2. Selanjutnya kedua masa dicampur secara *drop by drop* dengan menggunakan agitasi 750 rpm untuk 60 menit dan dilanjutkan dengan meneteskan CaCl_2 (Moradhaseli *et al.*, 2013) dan (Mohanraj *and* Chen., 2006).

Uji Stabilitas

Pengujian stabilitas sampel berupa suspensi ekstrak dan suspense partikel adalah dengan metode *heating cooling cycle* selama 6 siklus dalam tiga variasi pH. Suspensi sampel digunakan sebanyak 5 mL dengan factor pengenceran 10. Larutan buffer yang digunakan adalah buffer fosfat. Selama siklus stabilitas dilakukan penetapan kadar ekstrak di dalam partikel untuk mengetahui penurunan kadar setelah siklus berakhir. Penurunan kadar diketahui berdasarkan persamaan di bawah ini

$$\% \text{Penurunan Kadar} = \frac{\text{Nilai parameter hari ke 1} - \text{Nilai parameter hari ke 12}}{\text{Nilai parameter hari ke 1}} \times 100\% \dots \dots \dots (7)$$



Penentuan Properti Fisik Partikel

Properti fisik dari partikel yang diuji pada penelitian ini adalah ukuran, kesefragaman, dan pontensial zeta dari partikel yang dihasilkan oleh alat *Particle Size Analyzer* (PSA) Suspensi submikro partikel kitosan natrium alginat *loading* ekstrak buah pare digunakan sebanyak 50 μL ditambahkan pada 5 mLakuabides, kemudian diambil 100 μL dan dimasukkan ke dalam kuvet PSA, Pengukuran dilakukan secara triplo.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Ekstrak

Sampel berupa ekstrak dilakukan identifikasi fitokimianya meliputi uji kualitatif metabolit sekunder dalam buah pare. Hasil penentuan kualitatif senyawa metabolit sekunder seperti tertera pada Tabel 2.

Tabel 2.

Uji Kualitatif Kandungan Metabolit Sekunder Dapam Buah Pare

Kelompok senyawa	Reagen	Kriteria
Alkaloid	Mayer	+
	Wagner	+
	Dragendorf	+
Flavonoid	Asam klorida dan Magnesium	+
	Natrium hidroksida	+
Terpenoid/Steroid	Liebermen-Buchard	-
Saponin	Air + asam klorida	+

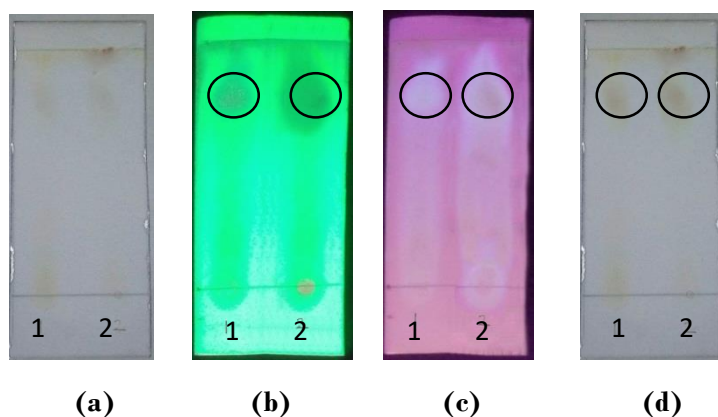
Kriteria

(+) = Positif

(-) = Negatif

Uji kualitatif kandungan flavonoid memberikan hasil positif dengan logam magnesium dan asam klorida. Warna merah yang dihasilkan dibandingkan dengan standar. Penguatan hasil positif ditandai dengan uji lanjutan menggunakan pereaksi natrium hidroksida. Uji kualitatif kandungan alkaloid memberikan hasil yang positif untuk reagen Dragendorff membentuk ikatan kovalen koordinat antara nitrogen dengan K^+ yang merupakan ion logam dan logam merkuri pada reagen Mayer. Hasil KLT dari ekstrak buah pare diketahui bahwa adanya kandungan flavonoid dengan standar kuersetin. Pemeriksaan dilaksanakan pada plat silika aktif yang dapat befluoresen. Kesetaraan R_f yang dihasilkan sampel dan standar ditunjukkan oleh Gambar 2. Fasa gerak yang digunakan adalah campuran n-heksan

dan etil asetat dengan perbandingan 3:4 dan penapak noda adalah alumunim klorida di bawah sinar UV pada lamda 254 dan 366 nm.

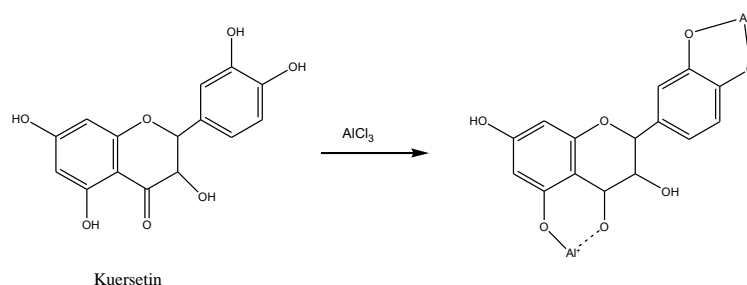


Keterangan gambar:
1 : Kuersetin
2 : Ekstrak

Gambar 2: (a) Sinar tampak (b) UV 254 nm (c) UV 366 nm (d) dengan reagen AlCl_3

Pengukuran Kadar Total Flavonoid

Penentuan kadar flavonoid menggunakan metode AlCl_3 berdasarkan formasi kompleks antara AlCl_3 dengan gugus $\text{C}=\text{O}$ dari atom C-4 dan gugus OH pada atom C-3 atau C-5 yang berdekatan dari kelompok flavon dan flavonol. Sebagai baku perbandingan digunakan kuersetin. karena kuersetin merupakan flavonoid golongan flavonol yang memiliki gugus keto pada atom C-4 dan juga gugus hidroksil pada atom C-3 dan C-5 yang bertetangga seperti yang terlihat pada Gambar 3.



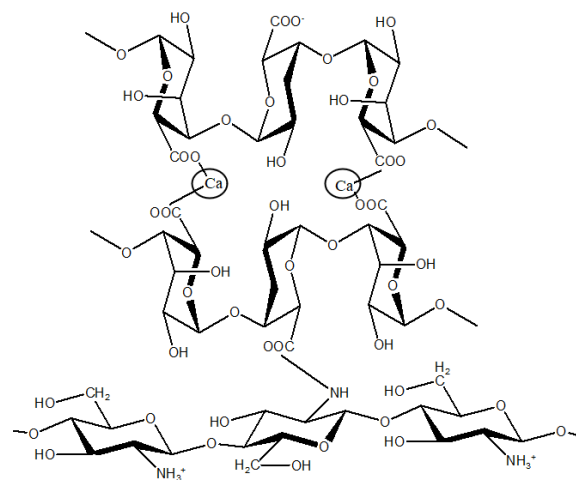
Gambar 3: Interaksi gugus hidroksil dengan logam Al

Penentuan absorbansi standar untuk kurva kalibrasi dilakukan pada lamda maks 454 nm dari serial konsentrasi kuersetin. Selanjutnya ditentukan juga

absorbansi dari sampel berupa larutan ekstrak buah pare yang dilarutkan dengan etanol. Kadar flavonoid total dalam ekstrak adalah $18,807 \pm 1,085$ mg/L.

4.1 Pembuatan Submikro Partikel Ekstrak Buah Pare

Preparasi partikel pembawa ekstrak pare adalah dengan mencoba variasi dari tiga volume (20, 40, dan 100 μ L) dari stabilizer penyambung pada formula submikropartikel kitosan-natrium alginat. Pada lapisan terdalam ada kitosan yang berinteraksi dengan ekstrak dan lapisan selanjutnya adalah alginate yang bersambung silang dengan kation kalsium (Gambar 4).



Gambar 4: Interaksi kation kalsium sebagai *cross-linker*

Penentuan Persen EE

Metode penentuan adalah secara tidak langsung dengan melihat berapa banyak ekstrak yang tidak masuk ke dalam partikel. (Patel *et al.*, 2006). Jumlah yang terdeteksi adalah sebagai faktor pengurang dari jumlah awal yang dimasukkan dalam formula. Pengukuran kadar dilakukan dengan metode spektrofotometri dari supernatan hasil sentrifugasi pada proses pemurnian. Pengukuran absorbansi dilakukan terhadap serial konsentrasi standar kuersetin dan sampel. Hasil penetapan persen EE adalah seperti yang tertera pada Tabel.4.



Tabel 4.
Formula dan %EE

Kelompok	Variasi Kalsium Klorida	Persen Enkapsulasi
F1	0,02 mL	88,875±0,121
F2	0,04 mL	91,183±0,106
F3	0,10 mL	87,363±0,092

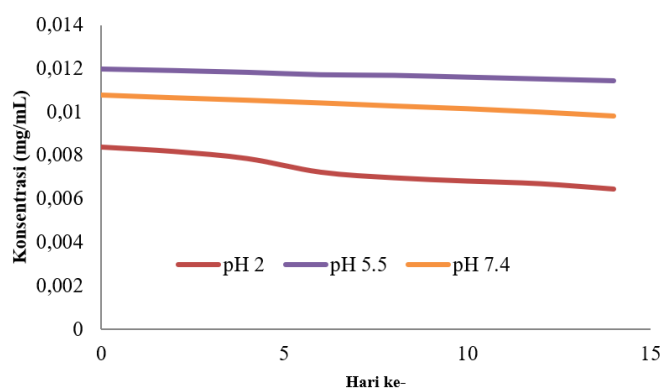
Persen EE pada F2 memperlihatkan kapasitas enkapsulasi yang terbaik setelah diolah dengan statistik terhadap ketiga formula. Hasil ini dipengaruhi oleh penggunaan kation Ca yang berhubungan dengan pembentukan porositas partikel yang menjerap ekstrak.

Karakterisasi Partikel

Penentuan properti fisik seperti ukuran, keseragaman, dan muatan elektrostatis partikel adalah berguna untuk evaluasi apakah partikel dapat diaplikasikan untuk sediaan farmasi. Properti fisik ini ditentukan dengan alat penganalisis partikel dengan metode penghamburan cahaya dan sudut detector yang bisa diaplikasikan untuk pembeda ukuran partikel, distribusi, dan muatan elektrostatis. Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah dari Horiba. Hasil penentuan ukuran, keseragaman, dan muatan elektrostatis adalah berukuran 931,3 nm dengan indeks keseragaman 0,328. dan potensial zeta +25,6 mV.

Penentuan pH dan Kadar Ekstrak Dalam Partikel Selama Uji Stabilitas

Evaluasi terhadap kestabilan produk merupakan faktor yang menentukan pemilihan formula. Pada penelitian ini suspensi partikel dikondisikan dalam tiga variasi pH yaitu 7,4 fisiologis, 5,5 mendekati asam, dan 2,0 asam. Metode uji stabilitasnya adalah penyimpanan pada suhu dingin 8°C dan panas 45°C secara bersiklus selama dua minggu (Ortega *et al.*, 2007). Perlindungan oleh biopolimer mampu meningkatkan stabilitas sampel yang diuji. Pengkondisian sampel yang diuji pada larutan dengan pH 2,0, 5,5 dan pH fisiologis 7,4 memperlihatkan pada pH fisiologis dengan hasil yang stabil, sedangkan pH 2,0 dan 5,5 adanya penurunan kadar ekstrak yang dijerap partikel seperti yang terlihat pada Gambar 5.



Gambar 5: Perbandingan penurunan kadar ekstrak dalam variasi pH

KESIMPULAN

Dari penelitian yang dilakukan diketahui bahwa variasi terbaik dari *cross-linker* yaitu 40 μ L untuk F2. Harga %EE dari tiga formula berturut-turut 88,875 \pm 0,121, 91,183 \pm 0,106, dan 87,363 \pm 0,092. Properti fisik dari F2 memiliki PDI, diameter, dan zeta potensial yaitu 0,328, 931,3 nm, dan +25,6 mV. Pada pH fisiologis 7,4 memperlihatkan hasil yang stabil, sedangkan pH 2,0 dan 5,5 adanya penurunan kadar ekstrak.

DAFTAR PUSTAKA

- Berne, B. J., & Pecora, R. (2000). *Dynamic light scattering: With applications to chemistry, biology, and physics*. Mineola, N.Y: Dover Publications.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., Chern, J. C., 2002. *Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods*. *J Food Drug Ana.* **10**:178-182.
- Chaplin, M. 2005, *Alginate water structure and behavior*, Applied Science, London South Bank University, London, United Kingdom.
- Coutinho, Henrique D.M & Jose G.M Costa., et al. 2009, *Effect of Momordica charantia L. in the resistance to aminoglycosides in methicilin-resistant Staphylococcus aureus*, Department of Biological Sciences, Universidade Regional of Cariri, Brazil, **33**:467 – 471
- Gupta, Rajiv, Sakshi Sehgal, dan Shubhini A. Saraf, 2011, Quantitative Estimation of Quercetin in Mimusops elengi L. (Bakul) Leaves by HPTLC, *Der Pharmacia Lettre*, **3**(5): 12-19.
- Hasanzadeh, K.M., Mohammad, K., Mobina, K. & Sahar, K. 2011, *Chitosan reinforcement of nanoparticles obtained by an ionic cross-linking process*, *Iranian Polymer Journal*, **20**(5): 445 - 456.



- Honarkar, H. & Mehdi, B. 2009, Applications of biopolymers I: chitosan, *J of Chem*, **9(140)**: 1403–1420.
- Horax, R., Hettiarachchy, N., & Chen, P. 2010, Extraction, Quantification, and Antioxidant Activities of Phenolics from Pericarp and Seeds of Bitter Melons (*Momordica charantia*) Harvested at Three Maturity Stages (Immature, Mature, and Ripe), *J. Agric. Food Chem*, **58(1)**: 4428–4433
- Kubola, Jittawan & Sirithon Siriamornpun. 2008, Phenolic contents and antioxidant activities of bitter melon (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro, *International Journal of Food Chemistry*, **11(1)** : 881 – 890
- Mardiyanto. 2013, “Investigation of nanoparticulate formulation intended for caffeine delivery into hair follicle”, *Disertasi*, Dr.rer.nat., Department of Pharmacy, Faculty of Science, Saarland University, Saarbruecken, Germany.
- Marks, R. 2004, *The stratum corneum barrier: the final frontier*, *J Nutr*, **134**:2017-2021.
- Mohanraj, V. & Chen, Y. 2006, Nanoparticles – A Review, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, **5(1)**:561-573.
- Moradhaseli, S., Abbas, Z.M., Ali, S., Nasser, M.D., Saman, S. & Mehraza, R.B. 2013, Preparation and characterization of sodium alginate nanoparticle containing ICD-85 (venom derived peptides), *International journal of innovation and applied studies*, **4**: 534–542.
- Novak, I., Janeiro, P., Seruga, M., & Oliveira-Brett, A.M. 2008, *Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection*, *Anal Chim Acta*, **630**:107–115.
- Patel, R.K., Patel, J.B. & Trivedi, P.D. 2015, Spectrophotometric method for the estimation of total alkaloids in the *Tinospora cordifolia* M. and its herbal formulations, *Int J Pharm Pharm Sci*, **7(10)**:249–251.
- Shin, S., Choi, J.G., Kang, O.K., Lee, Y.S., Oh, Y.C., Chae, H.S., et al. 2008, *Invitro activity of methyl gallate isolated from galla rhois alone and in combination with ciprofloxacin against clinical isolates of salmonella*, *J Microbiologi Biotechnol*, **18(11)**: 1848 – 1852.
- Wu, S.J., Ng, L.T., 2008. *Antioxidant and free radical scavenging activities of wildbitter melon (Momordica charantia Linn. var. abbreviate Ser.) in Taiwan*. *LWT –Food. Sci. Technol.* **41**, 323–330.