

Optimasi dan karakterisasi ekstrak polifenol teh hijau dari berbagai pelarut

Optimization and characterization of green tea polyphenol extract from various solvents

Shabri dan Dadan Rohdiana

*Pusat Penelitian Teh dan Kina Gambung
Desa Mekarsari Kecamatan Pasirjambu Kabupaten Bandung 40972*

E-mail: anas.shabri@yahoo.co.id

Diajukan: 01 Maret 2016; direvisi: 01 Maret 2016; diterima: 02 Maret 2016

Abstrak

Teh memiliki kandungan polifenol yang tinggi dengan aktivitas antioksidan sangat kuat dan bermanfaat untuk kesehatan. Ketersediaan polifenol dalam bentuk ekstrak masing sangat terbatas. Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimasi dan mengkarakterisasi ekstrak polifenol teh hijau dari beberapa pelarut. Parameter yang diuji berupa kandungan polifenol dan perolehannya pada berbagai kondisi proses ekstraksi. Hasil analisis menunjukkan bahwa proses ekstraksi menggunakan Aseton 70% dengan rasio teh terhadap pelarut 1 : 15 (b/v), suhu 60°C, selama 15 menit yang memberikan perolehan 40,17% b/b dan kadar polifenol dalam ekstrak sebesar 53,30% b/b.

Kata kunci: optimasi, karakterisasi, ekstraksi teh hijau, ekstrak polifenol

Abstract

Tea has a high content of polyphenols with potent antioxidant activity and beneficial for health. Availability of polyphenols extract is still very limited. The aim of this study to optimization and characterization of green tea polyphenol extract base on some solvents. Parameters analyzed were polyphenol content and yield of some extraction process conditions. This result showed that extraction by the ratio

of tea and solvent was 1 : 15 b/v, extracted by acetone 70% solution in temperature 60°C for 15 minutes obtain polyphenol content of 53,30% b/b and total yield of 40,17% b/b.

Keyword: optimization, characterization, green tea extraction, polyphenols extract.

PENDAHULUAN

Teh merupakan bahan baku minuman penyegar yang dipercaya mencegah, mengobati dan menghilangkan gejala penyakit dan telah digunakan selama beribu-ribu tahun. Penelitian tentang manfaat menyebarkan dari teh telah banyak dilakukan. Golongan kimia dalam teh yang paling besar peranannya dalam membentuk cita rasa dan khasiat istimewa adalah polifenol (Rohdiana, 2009). Komponen polifenol dalam teh terdiri atas flavanol, flavonol glikosida, flavonone, asam-asam. Flavanol merupakan komponen yang mendominasi (sekitar 75%) dari total polifenol dari teh hijau. Kandungan polifenol pada pucuk teh sekitar 13%–35% dari padatannya

(Ningrat, 2006; Rohdiana dkk, 2005; Hilton, 1973; Harler, 1963).

Polifenol mempunyai aktivitas sebagai antioksidan yang sangat kuat (Yi-fan, F. And Jia-shun, G., 2014). Kemampuannya menangkap radikal bebas 100 kali lebih efektif dari vitamin C dan 25 kali lebih efektif daripada vitamin E (Hagermae, 2002). Ilmu kedokteran modern bahkan sudah mengakui kegunaan polifenol dalam melawan penyakit-penyakit seperti penyempitan pembuluh darah, kelebihan kolesterol darah, tumor, sel kanker, obesitas dan diabetes, karies gigi, dan sebagainya (Yang, C. S and Hong, J., 2014; LI, W., and TU, Y., 2014; Hara, 2008; Anderson and Polansky, 2002; Rohdiana, 2001; Pambudi, 2000; Purwanto, 2000;).

Industri hilir banyak memanfaatkan ekstrak polifenol (ekstrak teh hijau dengan kandungan polifenol yang tinggi) sebagai bahan baku dalam komposisi produknya antara lain industri makanan dan minuman, industri farmasi dan kosmetik. Peredaran produk ekstrak polifenol sangat terbatas di Indonesia dan itupun masih diimpor (Hara, 2008).

Semakin maju tingkat kehidupan masyarakat, akan semakin perhatian terhadap manfaat kesehatan dari teh, sehingga mendorong para peneliti untuk memperoleh polifenol dalam bentuk ekstrak. Beberapa metode pemisahan (ekstraksi) dikembangkan di Jepang, Cina, Korea, juga di Indonesia antara lain ekstraksi dengan air dan pelarut organik, membran semipermeabel sampai dengan menggunakan teknik ultrasonik. Hara (2008) membandingkan penggunaan pelarut air, kloroform dan etil asetat untuk memperoleh katekin kasar. Druzynska, *et al.* (2007) menggunakan pelarut aseton, etanol, dan air distilasi untuk

mengekstraksi teh hijau. Ekstraksi polifenol menggunakan membran ultrafilter dan osmosis balik (*reverse osmosis*) dilakukan oleh Zhang dan Matsuuro (1991). Rohdiana dan Shabri (2007) melakukan pemisahan polifenol teh hijau dari komponen makromolekul dan kafein menggunakan membran mikrofilter, ultrafilter dan nanofilter serta osmosis balik. Lee, L.S *et al.* (2013) melakukan optimasi ekstraksi polifenol menggunakan ultrasonik. Sriyanto dan Purwatiningsih (2008) melakukan optimasi ekstraksi polifenol dari teh hijau menggunakan air pada suhu 80°C.

Ekstraksi teh hijau menggunakan pelarut organik memberikan keuntungan terutama pelarut yang selektif terhadap senyawa polifenol. Untuk memperoleh ekstrak teh hijau yang mempunyai kandungan polifenol tinggi diperlukan bahan baku berupa teh hijau yang tinggi polifenolnya, proses dan penggunaan pelarut yang selektif terhadap polifenol. Oleh karena itu diperlukan penentuan proses optimal untuk mendapatkan ekstrak polifenol yang tinggi dari teh hijau menggunakan beberapa pelarut organik.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia dan *Pilot Plant* Pengolahan Teh, Kelompok Peneliti Pascapanen Pusat Penelitian Teh dan Kina Gambung, Bandung, Jawa Barat.

Pengolahan teh hijau

Teh hijau diproses dari bahan baku berupa pucuk teh (p+3) klon GMB7 dengan pengolahan sistem *steaming* selama 2 menit. Teh hijau kering yang dihasilkan di-

gerus menggunakan mesin *cutter* atau *crusher* dan diayak menggunakan ayakan ASTM mesh 14. Fraksi yang lolos digunakan sebagai bahan baku proses ekstraksi. Parameter yang diamati adalah kadar air dengan menggunakan Brabender Moisture Tester, kadar ekstrak air (*water extract*) menggunakan metode ISO 9768:1994(E), kadar polifenol diuji dengan metode kolorimeter Folin-ciocalteu reagent (ISO 14502-1:2005 (E) pada panjang gelombang 740nm dan mengacu pada prosedur penentuan polifenol di SNI 7707:2011 Teh Instan.

Perbandingan pelarut organik sebagai pengekstrak

Teh hijau diekstraksi oleh pelarut A) air demineral (air distilasi), (B) aseton 70%, (C) etanol 70%, (D) etil asetat, dan (E) diklorometan (metilen klorida) pada labu ekstraktor (1:10 b/v) selama 60 menit dan suhu dijaga 60°C. Ekstrak cair kemudian disaring menggunakan kain kasa 200-250 mesh. Parameter yang diamati meliputi kadar ekstrak (*yield atau rendemen*) dan kadar polifenol dalam ekstrak untuk memilih penggunaan pelarut yang paling optimal dalam mengekstraksi polifenol dari teh hijau. Masing-masing perlakuan diulang 3 (tiga) kali. Alur proses ekstraksi ditunjukkan pada Gambar 1.

Ekstraksi teh hijau dengan variasi konsentrasi pelarut terpilih

Teh hijau diekstrak dengan variasi konsentrasi pelarut (solvent) aseton dalam air yaitu air, pelarut organik 20%, pelarut organik 40%, pelarut organik 60%, pelarut organik 70%, pelarut organik 80%, pelarut organik 99,7%. Proses ekstraksi mengikuti

alur proses ekstraksi pada Gambar 1. Parameter yang diamati adalah rendemen dan kadar polifenol dalam ekstrak teh hijau. Semua perlakuan diulang sebanyak 3 (tiga) kali. Hasil ekstraksi tertinggi (rendemen dan kadar polifenol) dioptimasikan dengan variasi ratio dan waktu.

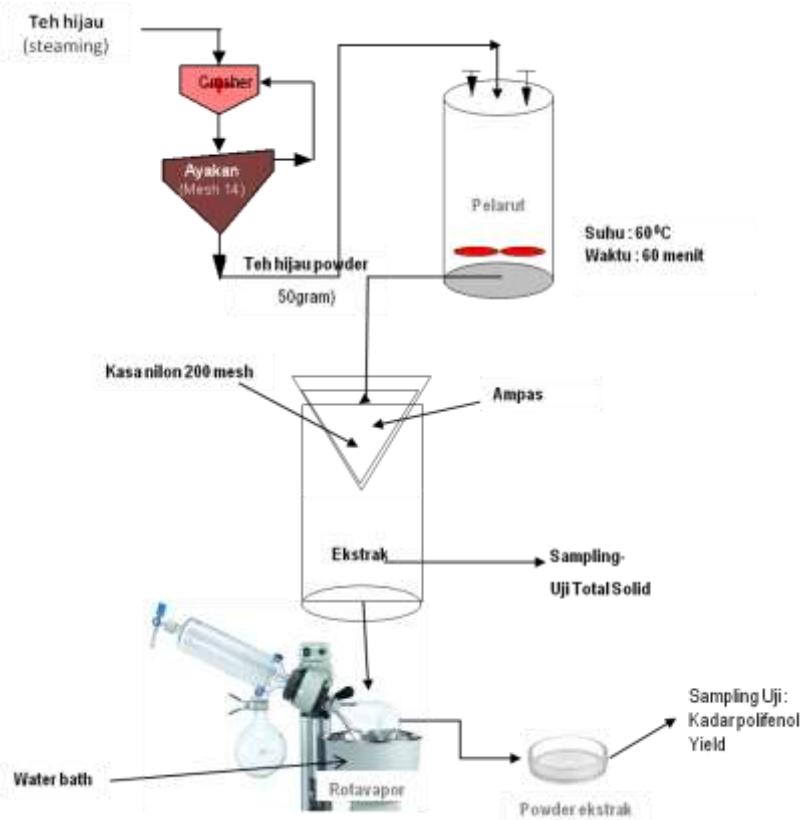
Optimasi penggunaan pelarut organik terpilih sebagai pengekstrak polifenol

Teh hijau diekstrak dengan variasi ratio (R) dan waktu (T) 1 : 10, 1 : 15, 1 : 20, 1 : 25, 1 : 30 (b/v), dengan waktu proses ekstraksi 15 menit, 30 menit, 60 menit, 90 menit, dan 120 menit. Parameter pengamatan adalah kadar ekstrak (rendemen) dan kadar total polifenol. Semua perlakuan diulang 3 (tiga) kali. Untuk mengetahui hubungan antar variabel (parameter) pengamatan digunakan uji beda nyata Tukey.

HASIL DAN PEMBAHASAN

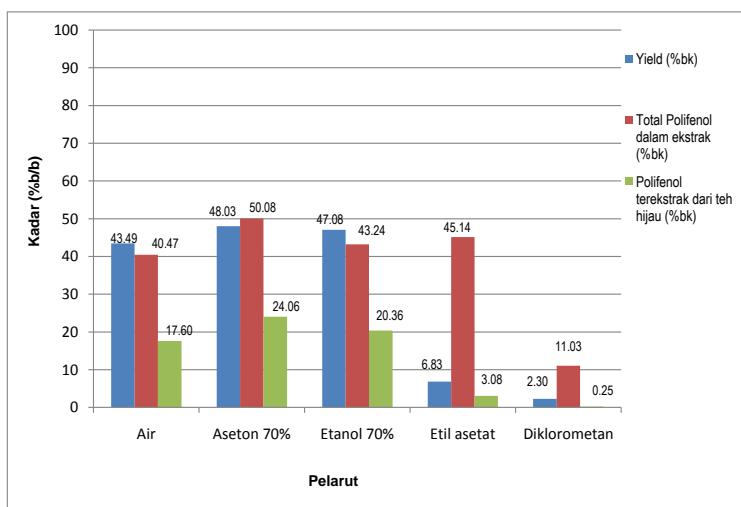
Analisis bahan baku

Hasil analisis kadar air, ekstrak air dan polifenol menunjukkan bahwa teh hijau yang digunakan pada penelitian ini telah sesuai dengan standar mutu R-SNI teh hijau. Teh hijau yang digunakan pada penelitian ini secara khusus diproses dari bahan baku yang baik yakni pucuk teh petikan halus (peko + 3 daun) dari varietas *Assamica* klon GMB sehingga hasil analisisnya jauh melebihi parameter mutu yang dipersyaratkan. Kadar ekstrak air dan total polifenol yang tinggi bermanfaat untuk menghasilkan rendemen ekstrak polifenol



GAMBAR 1

Proses ekstraksi polifenol teh hijau.



GAMBAR 2

Grafik perbandingan jenis pelarut terhadap rendemen dan polifenol.

yang tinggi dalam proses ekstraksi. Hasil analisis parameter mutu teh hijau dapat dilihat pada Tabel 1.

Perbandingan jenis pelarut organik

Hasil analisis menunjukkan bahwa ekstraksi dengan pelarut aseton 70% diperoleh ekstrak dengan kadar polifenol sebanyak 50,09% (b/b) yang merupakan hasil tertinggi dibanding pelarut lainnya. Begitu juga pengamatan terhadap rendemennya, pelarut aseton 70% dapat menghasilkan ekstrak teh hijau tertinggi, 48,03% (b/b). Jika dikombinasikan antara pengamatan rendemen dan polifenol maka pelarut aseton 70% memberikan hasil tertinggi dalam mengekstraksi polifenol yakni 24,06% seperti ditunjukkan pada Gambar 2.

Ekstraksi teh hijau dengan variasi konsentrasi aseton-air

Hasil analisis menunjukkan bahwa penggunaan aseton murni sebagai pelarut memberikan rendemen yang sangat rendah, yaitu 6,7%. Sedangkan jika aseton dicampur dengan air diperoleh rendemen setinggi 46,1% seperti ditunjukkan pada Gambar 3. Hal ini berlaku juga pada analisis polifenol.

Penggunaan air sebagai campuran pelarut aseton berpengaruh terhadap perolehan kadar polifenol dalam ekstrak keringnya, seperti ditunjukkan dalam Gambar 4. Perolehan ekstrak polifenol jika dilihat dari kombinasi antara *rendemen* dan kadar polifenol dalam ekstrak yang dihasilkan, maka diperoleh hasil optimal pada penggunaan campuran pelarut aseton 70% dalam air mampu mengekstraksi polifenol sebesar 23,2% dari teh hijau keringnya, seperti ditunjukkan pada Gambar 5.

Optimasi penggunaan pelarut

Secara tunggal, faktor rasio antara berat teh hijau dengan volume pelarut (R) dan waktu (T) proses ekstraksi memberikan pengaruh yang nyata terhadap rendemen pada rasio 1 : 10 b/v dan 1 : 15 b/v. Namun setelah volume pelarut diperbesar mulai dari rasio 1 : 20 b/v, rendemen yang diperoleh berpengaruh relatif kecil. Demikian juga waktu proses ekstraksi teh hijau menggunakan pelarut aseton 70% dalam air tidak memberikan pengaruh terhadap rendemen. Lama ekstraksi tidak mempengaruhi perolehan rendemen. Ini berarti bahwa untuk mendapatkan hasil ekstrak teh hijau yang optimal dilakukan proses ekstraksi selama 15 menit dengan rasio antara teh hijau dan pelarut adalah 1 : 15 b/v. Hasil analisa rendemen tertera pada Tabel 2.

Secara tunggal faktor rasio antara berat teh hijau dengan volume pelarut (R) pada proses ekstraksi memberikan pengaruh yang nyata terhadap kandungan polifenol dalam ekstrak. Polifenol cenderung mudah larut dalam air, karena adanya gula yang terikat dan sebaliknya adanya aglikon yang bersifat kurang polar, maka cenderung mudah larut dalam pelarut semi-polar (Markham, 1988). Faktor rasio ini memberikan pengaruh bahwa semakin besar jumlah pelarutnya maka semakin kecil kadar polifenol dalam ekstraknya. Oleh karena itu secara tunggal rasio yang digunakan R 1 : 10 diperoleh ekstrak polifenol yang lebih sedikit dibandingkan dengan rasio pelarut yang lebih besar. Setelah menggunakan rasio 1 : 15 b/v atau yang lebih besar dari itu, maka tidak terdapat pengaruh yang nyata. Rasio 1 : 10 b/v diperoleh kadar polifenol rata-rata lebih tinggi dari rasio yang lainnya. Sedangkan faktor waktu ekstraksi tidak memberikan

pengaruh terhadap kadar polifenol dalam ekstraknya. Sehingga waktu ekstraksi ditentukan oleh waktu yang tercepat yaitu 15 menit. Hal ini ditunjukkan dalam Tabel 3.

Hasil analisis polifenol dan analisis rendemen menunjukkan bahwa proses ekstraksi polifenol teh hijau yang optimal adalah ekstraksi menggunakan pelarut aseton 70% dalam air pada rasio teh-pelarut 1 : 15 b/v, lama proses 15 menit dan suhu operasi 60 °C. Pada kondisi proses tersebut diperolehan rendemen 40,17% b/b dan kadar total polifenol dalam ekstrak sebesar 53,30% b/b.

Ekstrak yang diperoleh berupa serbuk (*powder*) dengan kualitas kimia, fisik dan inderawi seperti ditunjukkan pada Tabel 4.

Ekstrak teh hijau dari hasil ekstraksi berbagai pelarut memiliki karakter yang

berbeda-beda. Ekstrak aseton 70% memiliki kandungan polifenol tertinggi, kenampakan fisik hijau kecoklatan gelap, sifat inderawi baik, demikian juga dengan ekstrak etanol 70% yang memiliki warna seduhan yang sangat baik. Sedangkan ekstrak air memiliki sifat inderawi yang terbaik diantara semua pelarut.

Untuk memenuhi permintaan minuman penyegar, pelarut yang umum dipakai dalam mengekstraksi teh hijau kering adalah air, karena memiliki sifat inderawi (warna, rasa dan aroma) terbaik. Permintaan farmasi yang menghendaki kadar bahan aktif sebagai indikator paling penting, maka ekstrak aseton 70% merupakan pilihan terbaik. Ekstrak etanol 70% juga dapat juga digunakan dalam memenuhi industri farmasi.

TABEL 1
Hasil identifikasi teh hijau

No	Pengamatan	Hasil analisa (%)	R-SNI Teh Hijau
1	Kadar air	4,40 ±0,07	Maks. 8%
2	Kadar ekstrak air	50,08±0,76	Min. 32%
3	Kadar total polifenol	23,20±0,76	Min. 15%

TABEL 2
Hasil rata-rata analisa *rendemen* dalam ekstrak teh

Perlakuan	Rendemen (%)				
	Rasio	15 menit	30 menit	60 menit	90 menit
R 1:10		36.58±0,55	36.59±0,56	36.68±0,40	37.25±0,02
R 1:15		40.17±0,44	41.68±1,11	41.68±1,11	42.47±0,74
R 1:20		42.05±0,59	44.19±0,96	44.30±1,11	44.38±0,04
R 1:25		44.28±0,01	45.38±0,05	45.21±0,11	45.84±0,41
R 1:30		45.17±0,50	45.84±0,41	45.97±0,22	46.10±0,04

TABEL 3

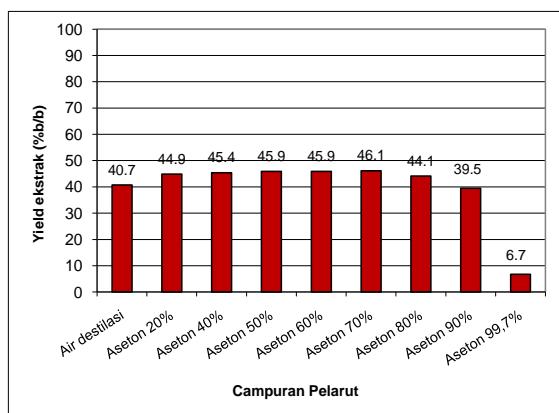
Hasil rata-rata analisa kadar polifenol dalam ekstrak teh

Perlakuan	Polifenol dalam ekstrak (%)					
	Rasio	15 menit	30 menit	60 menit	90 menit	120 menit
R 1:10		50.84±3,31	52.31±0,58	51.51±0,13	49.47±1,48	50.72±2,46
R 1:15		53.30±1,98	48.20±2,21	48.09±2,87	48.22±2,74	46.72±3,39
R 1:20		52.19±3,11	49.09±2,87	47.78±2,48	48.01±2,83	44.63±1,73
R 1:25		46.14±1,35	45.95±1,8	47.63±0,90	47.21±2,13	48.28±2,23
R 1:30		47.46±1,56	47.69±1,35	46.53±0,08	44.06±0,16	44.71±0,21

TABEL 4.

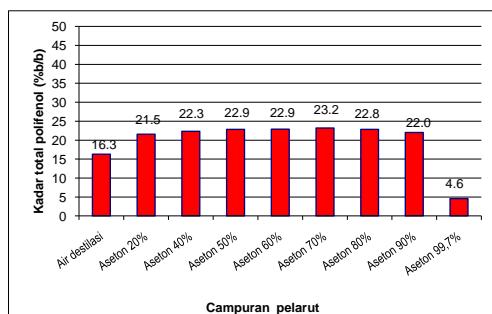
Karakter kimia, fisik dan inderawi ekstrak polifenol teh hijau dari beberapa pelarut

Uraian bahan	Kadar Polifenol (%)	Warna powder ekstrak (A-E)	Air seduhan		
			Warna (1-5)	Rasa (21-49)	Aroma (1-5)
Ekstrak Aseton 70%	50,08±1,37	(B) Hijau gelap kecoklatan	(4) Hijau gelap kekuningan	(41) Sepet, strength, hars/mentah	(c) Khas teh-normal
Ekstrak Etanol 70%	43,24±0,37	(B) Hijau kecoklatan	(5) Hijau kekuningan	(41) Sepet, strength, hars/mentah	(c) Khas teh-normal
Ekstrak Etil asetat	45,14±1,85	(B) Kekuningan	(4) Kuning kehijauan	(41) Sepet, Strength	(d) Sedikit bau etil asetat
Ekstrak Air	40,47±0,55	(B) Hijau kecoklatan terang	(4) Hijau kekuningan terang	(45) Strength	(c) Khas teh-normal
Ekstrak Diklorometan	11,03±0,30	(B) Hijau gelap	(3) Hijau	(35) Soft, hars, mentah	(d) Daun mentah



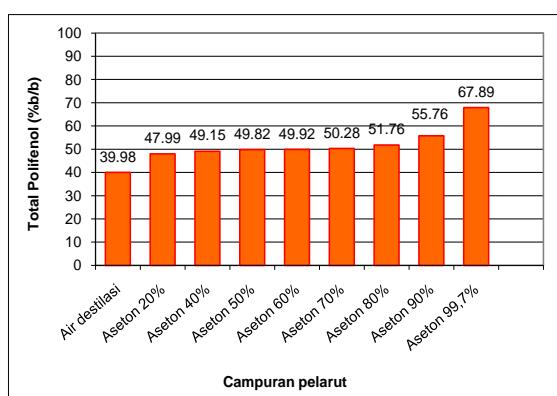
GAMBAR 3

Hubungan penggunaan campuran pelarut aseton dalam air terhadap rendemen yang dihasilkan.



GAMBAR 4

Hubungan penggunaan campuran pelarut aseton dalam air terhadap kadar total polifenol dari teh hijau keringnya.



GAMBAR 5

Hubungan penggunaan campuran pelarut aseton dalam air terhadap perolehan kadar total polifenol dalam ekstrak keringnya.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstraksi teh hijau menggunakan pelarut aseton 70% dalam air menghasilkan ekstrak polifenol tertinggi. Proses ekstraksi polifenol teh hijau optimal dengan menggunakan teh hijau berkadar polifenol 23,20% b/b, pelarut aseton 70% dalam air pada rasio antara teh-pelarut 1 : 15 b/v dengan durasi waktu 15 menit, suhu 60°C diperoleh rendemen ekstrak kering sebanyak 40,17% dengan kadar polifenol 53,30%. Penambahan waktu dan rasio hanya memberikan pengaruh yang kecil dalam perolehan total polifenol yang terekstrak.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, A. R. and Polansky, M. 2002. Tea Enhances Insulin Activity: *J. Agric. Food Chem.* 50, 7182-7186
- Bambang K., dan T. Suhartika .1995. Potensi teh Indonesia ditinjau dari aspek kesehatan. Laporan Hasil Litbang Teknik Produksi dan Pasca Panen Teh dan Kina, 1994/1995.
- Badan Standardisasi Nasional. 2011. Pengujian kadar total polifenol. *SNI 7707:2011 Teh instan butir A.5.Jakarta: BSN*
- Druzynska, B., Stepniewska, A., Wolosiak, R. 2007. The influence of time and type of solvent on efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extract. *Acta Sci. Pol., Technology. Aliment* (6) 2007, p 27-36.

- Hagermae, A.E., 2002. Tannin Chemistry, <http://www.users.muohio.edu/hagermae/tannin.pdf>
- Hara, Y. 2008. Development of tea catechin into pharmaceuticals. *Proceeding of the 3rd International conference on O-CHA (Tea) Culture and Science*, Japan: Shizuoka
- Hara, Y. 1991. Prophylactic functions of tea polyphenols. *Food Research Laboratories Mitsui Norin Co., Ltd.* hal 1-2
- Harler N. R. 1963. Tea Manufacture. Oxford University Press.
- Hilton, P. J. 1973. Tea. Encyclopedia of Industrial Chemical Analysis. (18), p 455-518
- International Standard of Organisation. 1994. Tea-Determination of water extract. ISO 9768:1994(E). Switzerland: ISO
- International Standard of Organisation. 1994. ISO 14502-1:2005 (E) : Content of total polyphenols in tea: Colorimetric method using Folin-ciocalteu reagent. ISO 14502-1:2005 (E). Switzerland:ISO
- Lee, L. S. et al. 2013. Optimization of Ultrasonic Extraction of Phenolic Antioxidants from Green Tea Using Response Surface Methodology. *Journal Molecules* 2013, 18, 13530-13545.
- LI, W., and TU, Y. 2014. Tea Polyphenols Affect Cancer Cells on MAPK Pathways. *Proceedings of The International Tea Symposium 2014*. November 10-13, 2014. China: Hangzhou.
- Markham. K.R. 1988. Cara mengidentifikasi flavanoid. Terjemahan Kosasih Padmawinata, Bandung: Penerbit ITB
- Ningrat, S.D. 2006. Komposisi Kimia Daun Teh. Tek. Pengolahan Teh Hitam. Penerbit ITB. Bandung, p 33 – 43.
- Oewen Roosje R., dan Bambang, K. 2000. Pemanfaatan teh hijau dalam pencegahan karies gigi. *Pros. Seminar Sehari Teh untuk Kesehatan. Puslit Teh dan Kina*. Bandung. p. 29-35
- Pambudi J. 2000. Potensi teh sebagai sumber zat gizi dan perannya dalam kesehatan. *Pros. Seminar Sehari Teh untuk Kesehatan. Puslit Teh dan Kina*. Bandung. p: 21-28
- Purwanto, J.A. 2000. Epigalokatekin galat teh hijau sebagai pencegah kanker. *Pros. Seminar Sehari Teh untuk Kesehatan. Puslit Teh dan Kina*. Bandung. p: 3-7
- Rohdiana, D. 2001. Radical scavengers polyphenol. Majalah Farmasi Indonesia. 12(1) : 53-58
- Rohdiana, D., Raharjo, S., and Gardjito, M.2005. Evaluasi Daya Hambat Tablet Effervescent Teh Hijau pada Oksidasi Asam Linoleat, *Majalah Farmasi Indonesia*, 16 (2), 76-78
- Rohdiana, D., dan Shabri. 2007. Separasi katekin menggunakan membran filtrasi. *Pros. Seminar Nasional Rekayasa Kimia dan Proses 2007*. Semarang: Teknik Kimia Fakultas Teknik Undip.
- Rohdiana, D. 2009. Teknologi terkini proses pengolahan teh untuk mendukung industri hilir. *Prosiding Pertemuan Teknis Teh Nasional di Solo 14-15 Oktober 2009*. Bandung: Pusat Penelitian Teh dan Kina.

- Rohdiana, D. 2009, Teh Ini Menyehatkan, Telaah Ilmiah Populer, Cetakan Pertama. Penerbit Alfabeta, Bandung.
- Srijanto, B., dan Purwatiningsih. 2008. Optimasi ekstraksi polifenol dari teh hijau secara batch. *Jurnal Tumbuhan Obat Indonesia*. 1(1): 25-33.
- Yi-fan F., and G. Jia-shun. 2014. Study on in Vitro Antioxidant Activity of Water Extract and Anthocyanin from Zi-Juan Sun-dried Green Tea. *Proceedings of The International Tea Symposium 2014*. November 10-13, 2014. China: Hangzhou.
- Yang, C. S and J. Hong. 2014. Prevention of Chronic Diseases by Tea: Possible Mechanisms and Human Relevance. *Proceedings of The International Tea Symposium 2014*. November 10-13, 2014. China: Hangzhou.
- Zhang, S.Q., and Matsuura, T. 1991. Application of membrane separation processes for the concentration of green tea juice. *Proceeding of the International Symposium of Tea Science*. August 26-29, 1991. Japan: Shizuoka.