

Penelitian / Research

ANALISIS KATEKIN DAN EPIKATEKIN DALAM BIJI KAKAO SERTA PRODUK OLAHANNYA MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR SPEKTROMETRI MASSA

Catechin and Epicatechin Analysis in Cacao Bean and Cacao Products Using Liquid Chromatography Mass Spectrometry

Subagja¹⁾, Harmita²⁾, Herman Suryadi²⁾ dan Lukman Junaidi¹⁾

¹⁾ Balai Besar Industri Agro (BBIA)

Jl. Ir. H. Juanda No. 11, Bogor 16122

²⁾ Departemen Farmasi FMIPA UI, Depok

ABSTRACTS : *Cacao beans processing into cacao products may affect active compound contents in the final products, especially catechin and epicatechin. Temperature treatments during cacao processing can induce epimerization reaction of (-)-epicatechin to be (-)-catechin. Therefore, catechin and epicatechin ratio in the samples would be change. The aim of the research was to know the influence of temperature during cacao beans processing, especially catechin and epicatechin concentration. Samples taken during the process were cacao nib, cacao mass, cacao powder, and cacao butter. Analysis of catechin and epicatechin in samples was carried out by liquid chromatography mass spectrometry. Analytical conditions for catechin and epicatechin were using mobile phase A (0.1 % formic acid in deionized water) and mobile phase B (acetonitril-methanol = 50:50) at flow rate of 0.5 ml/min. Gradient elution were set at 0 minutes (10% B), 15 minutes (35% B), 20 minutes (40% B), 30 minutes (50% B), 35 minutes (60% B), and 35.1 minute (10% B). Mass spectrometer was set at ESI voltage (-) 3500 volt, desolvation temperature 300 °C, nebulizer pressure 50 psi, desolvation gas 10 L/min, and fragmentor voltage (-) 160 volt. Results of the research showed that ratio of catechin and epicatechin in cacao nib, cacao mass and cacao powder were 1:21,7; 1:20,0; and 19,3 respectively. Heat treatments during cacao mass processing showed a decrease tendency of catechin and epicatechin concentrations.*

Key words : analysis, catechin and epicatechin, cacao processing

PENDAHULUAN

Tanaman coklat atau kakao (*Theobroma cacao* L.) berasal dari Meksiko. Manusia pertama yang memanfaatkan kakao sebagai minuman adalah suku Aztec dan Maya yang tinggal di wilayah Meksiko tersebut. Oleh bangsa Spanyol tanaman ini dibawa ke Eropa pada abad ke-16 Masehi.. Selanjutnya, oleh bangsa Belanda, tanaman kakao ini ditanam di Pulau Jawa pada abad ke-18 Masehi (Sakdiyah, 2008). Walaupun tanaman kakao ini bukan tanaman asli Indonesia, namun saat ini negara Indonesia merupakan penghasil biji kakao ketiga terbesar di dunia setelah Pantai Gading dan Ghana (Anonim, 2004).

Berbagai upaya telah dilakukan oleh pemerintah untuk meningkatkan produktivitas kakao Indonesia. Upaya tersebut adalah selain menambah luas lahan produksi juga melakukan peremajaan serta rehabilitasi tanaman kakao. Peremajaan tersebut perlu

dilakukan mengingat tanaman kakao saat ini telah berumur rata-rata 15 tahun, padahal usia produktif tanaman ini adalah 6-12 tahun. Peningkatan produktivitas kakao nasional baik melalui perluasan lahan produksi maupun melalui peremajaan dan rehabilitasi telah dilakukan sejak tahun 2006 hingga tahun 2010. Diharapkan pada tahun 2010 nanti, luas lahan kakao Indonesia mencapai 1,1 juta hektar. Bahkan untuk tahun 2020, pemerintah telah menargetkan luas lahan perkebunan kakao sebesar 1,4 juta hektar dengan proyeksi produksi 2 juta ton per tahun. Jika ini terlaksana, maka diharapkan Indonesia akan mampu menempati posisi pertama penghasil kakao di dunia. Dengan demikian, Indonesia akan menggeser posisi Pantai Gading dan Ghana sebagai penghasil kakao nomor 1 dan 2 di dunia dengan kapasitas produksi setiap tahunnya masing-masing 1,5 dan 1 juta ton (Anonim, 2007).

Kandungan biji kakao yang bermanfaat bagi kesehatan adalah zat-zat yang tergolong kedalam kelompok polifenol. Diantara sekian banyak senyawa yang termasuk kedalam kelompok polifenol dan juga terdapat pada buah-buahan, sayur-mayur, teh, dan anggur merah adalah senyawa flavonoid. Khusus untuk kakao, senyawa flavonoid terdapat dalam biji kakao adalah katekin dan epikatekin, baik dalam bentuk monomer, dimer, trimer maupun oligomer (Keen *et al*, 2005; Roy *et al*, 2005). Menurut Wollgast (2004), total senyawa polifenol yang terdapat dalam biji kakao kering yang telah bebas lemak berkisar antara 15-20 % atau setara dengan 6% biji kakao segar yang dikering-anginkan (dengan kandungan lemak 54 % dan kandungan air 6 %) dan sekitar 5% pada biji kakao yang telah difermentasi. Menurut de Brito *et al* (2002), kandungan polifenol yang terdapat dalam kakao yang telah dihilangkan lemaknya berkisar antara 12-18 %. Senyawa utama dari kelompok polifenol tersebut adalah (+)-katekin, (-)-epikatekin, dan prosianidin. Prosianidin merupakan senyawa gabungan antara (+)-katekin dan (-)-epikatekin. Dalam biji kakao, 60% senyawa prosianidin ini tersusun dalam bentuk dimer.

Biji kakao memiliki manfaat kesehatan yang cukup banyak. Terdapat 4 (empat) kelompok manfaat kesehatan yang dimiliki biji kakao, yaitu : (1) manfaat sebagai antioksidan, (2) manfaat yang berkaitan dengan kanker, (3) manfaat yang berkaitan dengan kesehatan kardiovaskuler, dan (4) manfaat yang berkaitan dengan respon imun dan antiinflamasi. Keempat manfaat kesehatan tersebut berkaitan erat dengan senyawa polifenol yang dikandung biji kakao (Wollgast, 2004).

Pengolahan biji kakao menjadi produk olahannya dapat mempengaruhi kandungan katekin dan epikatekin yang ada didalamnya. Adanya perlakuan panas (pengaruh temperatur) selama proses pengolahan biji kakao dapat memicu reaksi epimerisasi dari (-)-epikatekin menjadi (-)-katekin. Akibatnya kandungan epikatekin dalam kakao akan berkurang sementara kandungan katekin akan bertambah (Kofink *et al*, 2007). Padahal ditinjau dari segi manfaatnya terhadap kesehatan, zat yang dapat memberikan manfaat yang lebih besar, secara *in vivo*, adalah (-)-epikatekin.

Mengingat demikian banyaknya komponen kimia yang terdapat dalam biji kakao, di sisi lain jumlah zat standar yang tersedia di pasaran terbatas, dan mahal harganya, maka diperlukan suatu metode yang dapat memantau perubahan komposisi kimia yang terdapat dalam biji kakao beserta produk olahannya. Metode analisis menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi yang dihubungkan dengan detektor spektrometer massa diharapkan mampu mengatasi keterbatasan-keterbatasan tersebut. Metode analisis ini memiliki kelebihan dibandingkan dengan metode kromatografi biasa dalam hal kemampuannya mengidentifikasi suatu senyawa berdasarkan rumus empiris dan bobot molekul ion (Anonim, 2005). Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh temperatur terhadap proses pengolahan dengan melihat/mengidentifikasi perubahan komponen-komponen yang terkandung dalam biji kakao, khususnya katekin dan epikatekin. Pengukuran kadar katekin dan epikatekin dalam penelitian ini, selain dimaksudkan untuk mengetahui kadar kedua zat tersebut dalam sampel juga digunakan untuk menilai pengaruh perlakuan panas selama proses pengolahan kakao.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian meliputi : (1) biji kakao diperoleh dari perkebunan kakao, Jember, Jawa Timur; (2) bahan standar (+)-katekin (Sigma-Aldrich, C1251), (-)-epikatekin (Sigma-Aldrich, E1753), larutan ES-TOF Tuning Mix G1969-85000 dan API-TOF Reference Mass Solution Kit G1969-85001; (3) bahan kimia untuk fase gerak seperti asetonitril, metanol, air deionisasi, asam format dengan kualifikasi *HPLC grade*; dan (4) bahan kimia untuk preparasi sampel seperti heksana, metanol, air dengan kualifikasi pro analisis.

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian meliputi : (1) seperangkat alat untuk mengolah biji kakao : lemari pengering/oven (Mommert), mesin penggiling (lokal), pengempa tekanan (lokal); (2) Kromatografi Cair Kinerja Tinggi merk Agilent Seri 1200 yang dilengkapi dengan kolom Zorbax Eclipse

XDB-C18 (4,6 mm x 150 mm, 5 µm, 80Å) dan alat Spektrometer Massa Waktu Lintas (*Time of Flight Mass Spectrophotometer*), merk Agilent Seri 6210; (3) seperangkat alat untuk analisis katekin dan epikatekin dalam biji kakao beserta produk olahannya : neraca analitik (Ohaus), *ultrasonic bath* (Branson), alat sentrifugasi (Hettich); dan (4) seperangkat alat untuk preparasi sampel : gelas piala, Erlenmeyer, labu ukur, tabung reaksi, rak tabung reaksi.

Metode penelitian

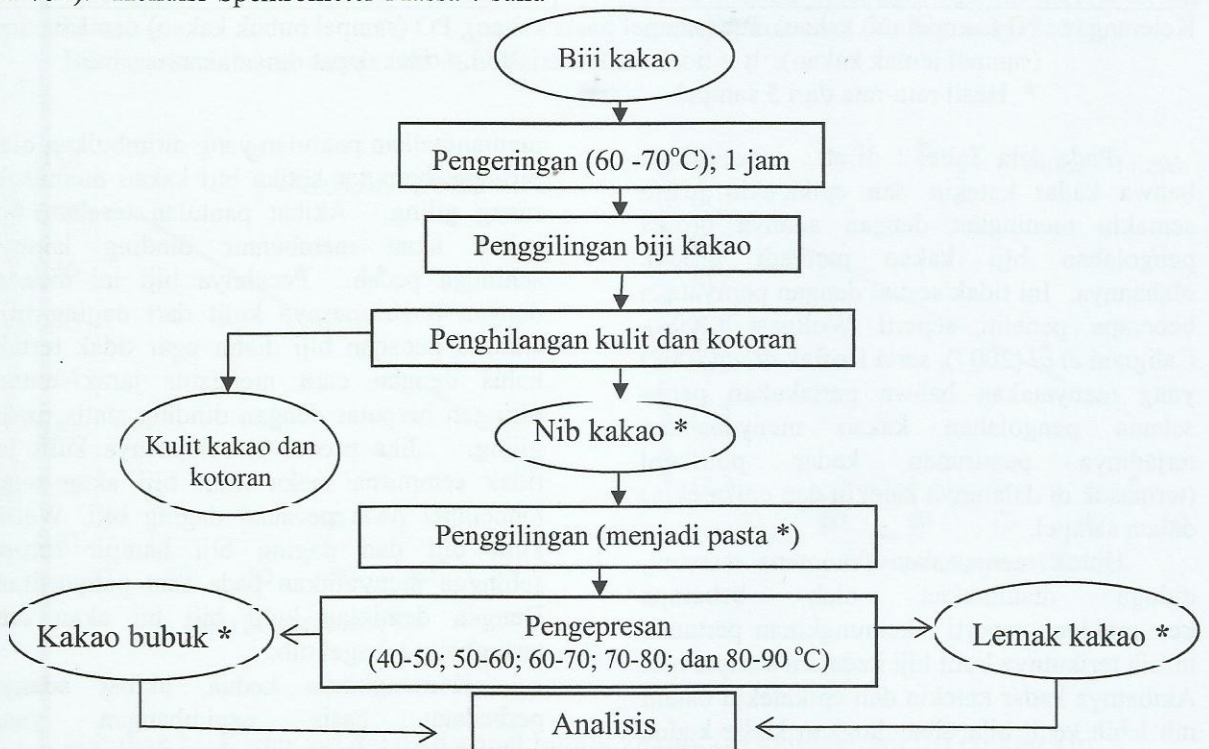
Analisis katekin dan epikatekin dalam sampel kakao dimaksudkan untuk mempelajari pengaruh temperatur selama proses pengolahan biji kakao menjadi produk-produk olahannya. Analisis dilakukan menggunakan alat kromatografi cair spektrometer massa dengan kondisi analisis sebagai berikut.

Kondisi Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) : laju alir 0,5 ml per menit; waktu operasi 40 menit; volume injeksi 5 µl; fase gerak A (0,1% asam format dalam air deionisasi); fase gerak B (Asetonitril : Metanol = 50 : 50); dengan perubahan komposisi fase gerak 0-15 menit (10-35 %B), 15-20 menit (35-40 %B), 20-30 menit (40-50 %B), 30-35 menit (50-60 %B), 35-35,1 menit (60-10 %B). Kondisi Spektrometer Massa : suhu

gas pengering 300 ° C; laju gas pengering ; tekanan pengabut 50 psi; tegangan fragmentasi 160 V; tegangan penyaring ion 60 V; tegangan frekuensi radio pada oktopol 250 V; dan tegangan ionisasi (ESI) diatur pada (-) 3500 V.

Dalam penelitian ini dilakukan pengolahan biji kakao seperti terlihat pada Gambar 1. Jenis sampel yang diambil adalah nib kakao, pasta kakao serta bubuk dan lemak kakao. Sampel bubuk dan lemak kakao merupakan hasil pengepresan pasta kakao yang dilakukan pada lima tingkat perlakuan temperatur yaitu : 40-50 °C, 50-60 °C, 60-70 °C, 70-80 °C dan 80-90 °C.

Sampel kakao tersebut sebelum dianalisis menggunakan KCKT dengan detektor spektrometer massa, dihilangkan lemaknya menggunakan metode yang dikembangkan oleh Wollgast (2004) yang telah dimodifikasi sebagai berikut : kedalam 0,5 gram sampel ditambahkan 5 ml n-heksana kemudian dilakukan sonikasi selama 5 (lima) menit dalam *ultrasonic bath*. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi pada 3000 g selama 10 (sepuluh) menit. Larutan n-heksana dibuang dengan cara dekantasi. Proses ini diulang sebanyak 2 (dua) kali. Endapan hasil sentrifugasi tersebut selanjutnya dikeringkan dengan cara mengalirkan gas nitrogen.



Keterangan : *) Pengambilan sampel

Gambar 1. Proses pengolahan biji kakao menjadi produk olahannya

Sampel yang telah dihilangkan kandungan lemaknya, ditambahkan larutan metanol sebanyak 4 ml dan air deionisasi sebanyak 1 ml. Kemudian diaduk menggunakan *stirrer* selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi pada 2000 g selama 15 menit.

Diambil bagian cairannya dan dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml. Selanjutnya ditambahkan larutan metanol 30% hingga tanda batas. Kemudian disaring menggunakan membran Millipore 0,45 μm . Hasil saringan dimasukkan ke dalam vial ukuran 2 ml. Jumlah yang diinjeksikan pada alat KCKT sebanyak 5 μl .

Area katekin dan epikatekin dicatat. Kadar katekin dan epikatekin dihitung menggunakan persamaan regresi linier yang

diperoleh dari kurva kalibrasi masing-masing zat tersebut dengan bantuan Microsoft Excel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebagai titik awal penilaian adalah sampel biji kakao yang telah dihilangkan kulitnya (nib). Untuk mendapatkan sampel ini hanya dilakukan proses pengeringan pada suhu 60 °C serta proses penggilingan ringan. Selanjutnya sampel nib ini dijadikan pasta menggunakan mesin giling dengan tekanan yang lebih besar dan kuat. Kemudian dilakukan pengepresan untuk memisahkan antara bubuk kakao dan lemak kakao. Pada tahap terakhir ini, digunakan 5 (lima) tahap perlakuan panas dengan rentang suhu 40 hingga 90 °C. Hasil analisis kadar katekin dan epikatekin dalam sampel kakao dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kadar katekin dan epikatekin dalam sampel kakao

No.	Kode sampel	Berat sampel (mg)	Kadar zat ($\mu\text{g}/\text{mg}$ sampel)		Rasio Katekin : Epikatekin
			Katekin	Epikatekin	
1.	NI	213,9	0,27	5,89	1 : 21,7
2.	PA	219,1	0,41	8,22	1 : 20,0
3.	PO	214,84 \pm 2,29*	0,55 \pm 0,02*	10,59 \pm 0,27*	1 : 19,3*
4.	LE	492,54 \pm 6,73*	tt	-(0,17 \pm 0,03)*	tdd

Keterangan : NI (sampel nib kakao), PA (sampel pasta kakao), PO (sampel bubuk kakao) dan LE (sampel lemak kakao). tt = tidak terdeteksi; tdd = tidak dapat dinyatakan.

* Hasil rata-rata dari 5 sampel.

Pada data Tabel 1 di atas dapat dilihat bahwa kadar katekin dan epikatekin justru semakin meningkat dengan adanya proses pengolahan biji kakao menjadi produk olahannya. Ini tidak sesuai dengan pernyataan beberapa peneliti seperti Wollgast (2004), Caligiani *et al* (2007), serta Kofink *et al* (2007) yang menyatakan bahwa perlakuan panas selama pengolahan kakao menyebabkan terjadinya penurunan kadar polifenol (termasuk di dalamnya katekin dan epikatekin) dalam sampel.

Untuk menjelaskan fenomena tersebut, diduga diakibatkan oleh beberapa kemungkinan seperti : kemungkinan pertama, masih terikutnya kulit biji kedalam sampel nib. Akibatnya kadar katekin dan epikatekin dalam nib lebih kecil bila dibandingkan kadar kedua zat tersebut dalam pasta kakao. Prinsip pemisahan antara kulit biji dengan daging biji yang terjadi dalam mesin giling adalah

memanfaatkan pantulan yang ditimbulkan oleh piringan berputar ketika biji kakao memasuki ruang giling. Akibat pantulan tersebut, biji kakao akan membentur dinding lainnya sehingga pecah. Pecahnya biji ini disertai dengan terkelupasnya kulit dari daging biji. Ukuran pecahan biji diatur agar tidak terlalu halus dengan cara mengatur jarak antara piringan berputar dengan dinding statis ruang giling. Jika proses terkelupasnya kulit ini tidak sempurna maka kulit biji akan tetap menempel pada pecahan daging biji. Warna kulit biji dan daging biji hampir serupa sehingga menyulitkan pada saat penyortiran. Dengan demikian kulit biji ini akan ikut tertimbang sebagai nib.

Kemungkinan kedua, akibat adanya perbedaan basis penimbangan yang menyebabkan kadar katekin dan epikatekin dalam pasta lebih kecil bila dibandingkan dengan kadar kedua zat tersebut dalam bubuk kakao. Menurut Grieve (1995) yang dikutip

oleh Junaidi *dkk* (2007), kandungan lemak dalam nib kakao sekitar 50 persen. Sementara berdasarkan analisis yang dilakukan oleh Balai Besar Industri Agro, kadar lemak yang terkandung dalam bubuk kakao berkisar antara 35 hingga 39 persen.

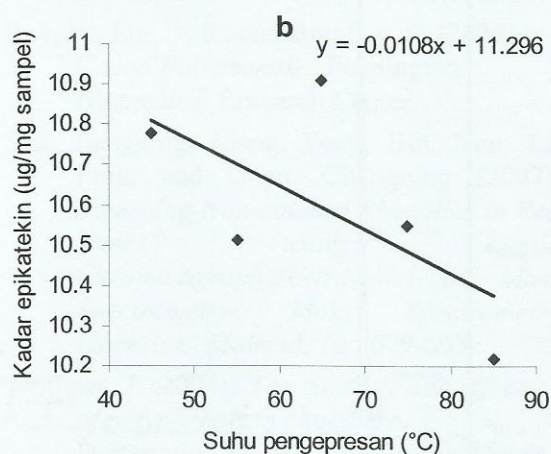
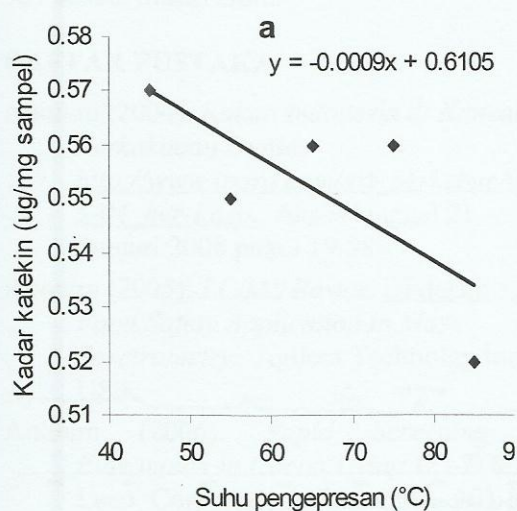
Kemungkinan ketiga, adalah faktor keragaman pada uji presisi cukup tinggi. Pada katekin nilainya sekitar 7 persen dan pada epikatekin sekitar 4,5 persen. Ketiga kemungkinan tersebut perlu dipertimbangkan jika hendak menilai pengaruh panas selama proses pengolahan kakao berdasarkan perubahan kadar katekin dan epikatekin dalam sampel.

Metode lain yang juga dapat digunakan untuk menilai adanya pengaruh panas selama pengolahan kakao adalah dengan melihat rasio/perbandingan antara katekin dan epikatekin. Cara ini telah digunakan oleh Kofink *et al* (2007), yang diperbandingkan antara senyawa (-)-katekin dan (-)-epikatekin. Senyawa (-)-katekin merupakan hasil reaksi epimerisasi dari (-)-epikatekin. Adanya reaksi epimerisasi tersebut dapat diamati secara tidak langsung melalui perubahan komposisi epikatekin dan katekin. Kadar epikatekin akan berkurang sementara kadar katekin akan bertambah (ada penambahan senyawa katekin yang merupakan hasil reaksi epimerisasi epikatekin).

Berdasarkan rasio antara katekin dan

epikatekin yang terdapat dalam sampel kakao terlihat bahwa rasio antara katekin dan epikatekin dalam nib kakao adalah 1:21,7. Rasio ini masih lebih besar bila dibandingkan dengan pasta kakao (1: 20,0), sedang dalam pasta kakao juga masih lebih besar bila dibandingkan dengan rasio rata-rata dalam bubuk kakao (1: 19,2). Dengan kata lain, proses pengolahan biji kakao menjadi produk olahannya memiliki pengaruh terhadap senyawa katekin dan epikatekin yang terkandung dalam biji kakao ditinjau berdasarkan rasio antara kedua zat tersebut.

Di dalam bubuk kakao sendiri yang merupakan hasil pengepresan pasta kakao pada rentang suhu 50 hingga 90 °C, sulit untuk dinyatakan bahwa perlakuan temperatur memiliki peran terhadap perubahan kandungan katekin dan epikatekin yang terdapat didalam sampel jika didasarkan atas rasio kedua tersebut. Meskipun demikian, jika dilihat berdasarkan kadar keduanya dalam sampel bubuk kakao menunjukkan kecenderungan yang semakin menurun seiring dengan naiknya temperatur, dapat dilihat pada Gambar 1. Pada gambar tersebut, tampak bahwa tren penurunan kadar epikatekin lebih besar bila dibandingkan dengan katekin. Hal ini menguatkan dugaan bahwa epikatekin relatif kurang stabil dibanding katekin karena terjadi reaksi epimerisasi (Kofink *et al*, 2007).



Gambar 1. Kadar zat dalam sampel bubuk kakao, (a) katekin dan (b) epikatekin

Untuk lemak kakao, pengaruh panas selama proses pengolahan kakao tidak dapat

dilakukan penilaian. Keberadaan katekin pada seluruh sampel lemak kakao tidak terdeteksi.

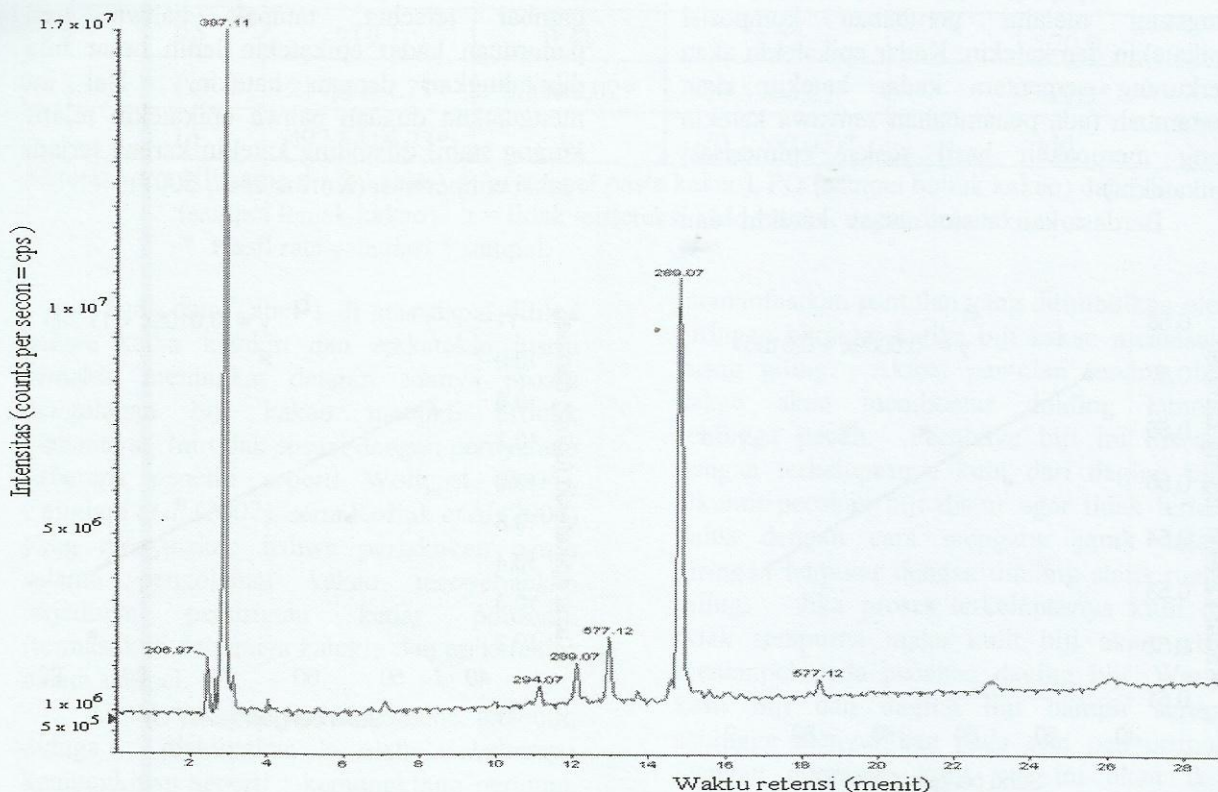
Sementara untuk epikatekin, kadar zat tersebut dalam sampel ini sedemikian kecilnya, berada jauh di bawah batas deteksi, sehingga ketika dihitung dengan kurva kalibrasi memberikan hasil negatif.

Terdapatnya epikatekin dalam sampel lemak kakao diduga karena terikutnya bubuk kakao kedalam lemak kakao selama proses pengepresan pasta kakao. Dugaan tersebut didasarkan pada hasil percobaan penghilangan lemak terhadap sampel lemak kakao. Setelah proses penghilangan lemak selesai, di dasar tabung reaksi terdapat sisa-sisa bubuk kakao yang berwarna coklat.

Selain untuk keperluan kuantitatif, analisis menggunakan kromatografi cair spektrometri massa juga dapat digunakan untuk keperluan kualitatif. Alat yang digunakan dalam penelitian ini merupakan alat kromatografi cair spektrometer massa penganalisis waktu lintas. Prinsip analisis kualitatif dengan alat ini didasarkan atas bobot molekul ion (nilai m/z) yang berhasil dideteksi, kemudian hasilnya dibandingkan dengan data

kepastakaan atau zat baku. Selain itu, bisa juga didasarkan atas rumus empiris yang diperoleh dari senyawa yang berhasil dideteksi tersebut.

Berdasarkan nilai m/z yang dihasilkan, sampel nib kakao menghasilkan 7 puncak, sampel pasta kakao menghasilkan 8 puncak, dan sampel bubuk kakao menghasilkan 8 hingga 11 puncak. Puncak-puncak dengan nilai m/z 387,11; 289,07; dan 577,15 terdapat dalam seluruh sampel. Puncak dengan nilai m/z 387,11 belum dapat diidentifikasi jenis senyawanya walaupun kadarnya dalam sampel cukup tinggi. Puncak dengan nilai m/z 289,07 merupakan bobot molekul katekin atau epikatekin yang kehilangan satu atom H $[M-H]^+$. Hasil tersebut didasarkan pada standar katekin dan epikatekin yang digunakan dalam penelitian ini. Waktu retensi (t_R) katekin lebih kecil dibanding epikatekin (t_R katekin 12,1 dan untuk epikatekin 14,8). Puncak dengan nilai m/z 577,15 merupakan bobot molekul dimer prosianidin yang kehilangan satu atom H $[M-H]^+$. Contoh kromatogram sampel nib kakao dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Kromatogram nib kakao

Menurut Anonim (2006), senyawa dengan m/z 577 merupakan dimer prosianidin B2 dan B5. Meskipun demikian, sulit untuk memastikan bahwa senyawa dengan nilai m/z

577,15 yang dihasilkan dalam penelitian ini, merupakan senyawa dimer prosianidin yang sama mengingat kondisi dan jenis alat yang digunakan tidak sama. Selain itu, ada senyawa

dimer prosianidin lain yang memiliki nilai m/z 577. Sun *et al* (2007) menyebut senyawa dengan nilai m/z 577 merupakan senyawa dimer prosianidin tipe B1 dan B2. Dalam penelitian ini tidak dapat dibedakan tipe prosianidin yang terdapat dalam sampel kakao. Sementara untuk lemak kakao, puncak yang tersisa tinggal 3 puncak. Ketiga puncak tersebut memiliki nilai m/z 206,97; 387,11; dan 289,07.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Berdasarkan rasio katekin dan epikatekin, proses pengolahan biji kakao menjadi produk olahannya mempengaruhi kandungan katekin dan epikatekin dalam biji kakao, ditandai dengan menurunnya rasio kedua zat tersebut.
2. Proses pengolahan pasta kakao menjadi bubuk kakao dan lemak kakao yang dilakukan pada rentang suhu 40 hingga 90 °C, tidak menunjukkan adanya pengaruh perlakuan berdasarkan rasio katekin dan epikatekin namun bila dilihat kandungan katekin dan epikatekin menunjukkan kecenderungan yang semakin menurun.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengidentifikasi senyawa dengan nilai m/z 387 satuan massa atom.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim (2004). *Kakao Indonesia di Kancah Perkakaoan Dunia*.
http://www.ipard.com/art_perkebun/nov_5-04_her-I.asp. Akses tanggal 21 Januari 2008 pukul 19.58
- Anonim (2005). *LC/MS Basics*. Di dalam : *Food Safety Application in Mass Spectrometry*. Agilent Technolgy Inc., USA.
- Anonim (2006). *Rapid Screening for Flavonoids in Cocoa Using LC-TOFMS*. Leco Corporation, Form No. 203-821-294 8/06-REVO.
- Anonim (2007). *Potensi Besar dari Kakao*. Bank Ekspor Indonesia
http://www.bexi.co.id/images/_res/Opini

- Potensi%20%Dari20Kakao.pdf*. Akses tanggal 21 Januari 2008 pukul 19.03
- de Brito, Eddy Sousa; Garcia, Nelson Horacio Pezoa; and Amancio, Allan Cesar; (2002). *Effects of Polyphenol Oxidase (PPO) and Air Treatments on Total Phenol and Tannin Content of Cocoa Nibs*. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, Campinas **22**(1):45-48.
- Caligiani, A.; Cirlini, M.; Palla, G.; Ravaglia, R.; and Arlorio, M., (2007). *GC-MS Detection of Chiral Markers in Cocoa Beans of Different Quality and Geographic Origin*. *Chirality*, 19 :329-334.
- Junaidi, L.; Sudibyo, A.; Hutajulu, T.F.; Abdurakhman, D.; Mardjuki; dan Chaldy, E., (2007). *Penelitian Ekstraksi Lemak Kakao yang Bersifat Spesifik untuk Bahan Kosmetika*. Laporan Penelitian Ilmu Pengetahuan Terapan, Balai Besar Industri Agro, Departemen Perindustrian.
- Keen, Carl L., Holt, Roberta R., Oteiza, Patricia I., Fraga, Cesar G., and Schmitz, Harold H. (2005). *Cocoa antioxidants and cardiovascular health*. *Am. J. Clin. Nutr.*, 81(suppl):298S-303S.
- Kofink, M., Papagiannopoulos, M., and Galensa, R. (2007). *(-)-Catechin in Cacao and Chocolate: Occurrence and Analysis of an Atypical Flavan-3-ol Enantiomer*. *Molecules*, 12:1274-1288.
- Roy, H., Lundy, S., and Brantley, P. (2005). *Cocoa Polyphenols*. Pennington Biomedical Research Center.
- Sun, Jiangping; Liang, Feng; Bin, Yan; Li, Ping; and Duan, Changqing (2007). *Screening Non-colored Phenolics in Red Wines using Liquid Chromatography/Ultraviolet and Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry Libraries*. *Molecul*, 12 : 679-693
- Wollgast, J. (2004). *The contents and effects of polyphenols in chocolate*. Dissertation of Faculty of Agricultural and Nutritional Sciences, Home Economics, and Environmental Management, University of Gießen, Germany.