

**KAJIAN TENTANG SEBATIAN PERISA MERUAP DALAM PRODUK COKLAT:
ANALISIS GC-FID**

ARNIE ANN JOHNNY

**DISERTASI INI DIKEMUKAKAN UNTUK MEMENUHI SEBAHAGIAN
DARIPADA SYARAT MEMPEROLEHI IJAZAH SARJANA MUDA SAINS
DENGAN KEPUJIAN DALAM KIMIA INDUSTRI**

**PERPUSTAKAAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH**

**SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH
KOTA KINABALU**

Mei,2008



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS@

JUDUL: KAJIAN TENTANG SEBATIAN PERISA MERUAP DALAM PRODUK

COKLAT: ANALISIS GC-FID

IJAZAH: SARJANA MUDA SAINS DENGAN KEPUSTIAN KIMIA INDUSTRI

SAYA ARNIE ANN JOHNNY

(HURUF BESAR)

SESI PENGAJIAN: 2005/2006

mengaku membenarkan tesis (LPSM/Sarjana/Doktor Falsafah) ini disimpan di Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dengan syarat-syarat kegunaan seperti berikut:-

1. Tesis adalah hakmilik Universiti Malaysia Sabah.
2. Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dibenarkan membuat salinan untuk tujuan pengajian sahaja.
3. Perpustakaan dibenarkan membuat salinan tesis ini sebagai bahan pertukaran antara institutsi pengajian tinggi.
4. Sila tandakan (/)

SULIT

(Mengandungi maklumat yang berdarjah keselamatan atau Kepentingan Malaysia seperti yang termaktub di dalam AKTA RAHSIA RASMI 1972)

TERHAD

(Mengandungi maklumat TERHAD yang telah ditentukan oleh organisasi/badan di mana penyelidikan dijalankan)

TIDAK TERHAD

Disahkan Oleh

NURULAIN BINTI ISMAIL

LIBRARIAN

UNIVERSITI MALAYSIA SABAH
(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

[Signature]
(TANDATANGAN PENULIS)

Alamat Tetap: K8. KIONGOM,
INANAM

DR. SUHAIMI MD. YASIR

Nama Penyelia

Tarikh: 12/05/08

Tarikh: 08/05/08

CATATAN:- *Potong yang tidak berkenaan.

**Jika tesis ini SULIT atau TERHAD, sila lampirkan surat daripada pihak berkuasa /organisasi berkenaan dengan menyatakan sekali sebab dan tempoh tesis ini perlu dikelaskan sebagai SULIT dan TERHAD.

@Tesis dimaksudkan sebagai tesis bagi Ijazah Doktor Falsafah dan Sarjana secara penyelidikan atau disertai bagi pengajian secara kerja kursus dan Laporan Projek Sarjana Muda (LPSM).



PENGAKUAN

Saya mengakui bahawa disertasi ini adalah hasil kajian saya sendiri, kecuali nukilan dan ringkasan yang setiap satunya telah saya jelaskan sumbernya.

26 Mei 2008



ARNIE ANN JOHNNY

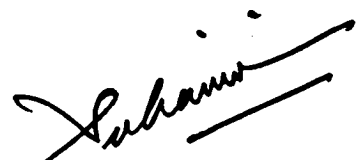
HS2005-3872



PENGESAHAN


Nama: Arnie Ann Johnny

Tajuk: Kajian tentang sebatian perisa meruap dalam produk coklat: analisis GC-FID



(Dr Suhaimi Md. Yasir)

PENYELIA



(Dr Nourie Surugau)

PEMERIKSA 1



(Prof. Madya Dr Marcus Jopony)

PEMERIKSA 2



DEKAN

SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI

Mei, 2008



PENGHARGAAN

Pertama sekali saya ingin mengucapkan syukur kepada Tuhan kerana dengan berkatnya saya dapat menyempurnakan penulisan desertasi ini dengan jayanya sebagai memenuhi syarat Universiti bagi tujuan penganugerahan Ijazah Sarjana Muda Sains dengan Kepujian walaupun terdapat cabaran dan rintangan yang terpaksa dihadapi sepanjang projek ini dijalankan.

Saya ingin mengucapkan setinggi-tinggi penghargaan dan jutaan terima kasih kepada penyelia projek iaitu Dr Suhaimi di atas segala bimbingan dan tunjuk ajar serta bantuan yang diberikan sepanjang tempoh menyiapkan projek ini. Tidak dilupakan juga kepada Prof Madya Dr Marcus Jopony, Dr Noumie Surugau dan semua pensyarah Kimia Industri atas dorongan dan nasihat yang diberikan.

Ucapan terima kasih juga ditujukan kepada staf-staf makmal Kimia Industri dan juga staf-staf Institut Penyelidikan Marin Borneo (IPMB) atas segala pertolongan yang diberikan. Ribuan terima kasih juga ditujukan khas kepada ibu dan ayah serta keluarga tersayang, teman-teman rapat terutama sekali Jerry Thomas, Dymphna Jane, Wan Nor Hafizah, rakan-rakan seperjuangan yang sentiasa bersama sepanjang projek ini berjalan serta semua yang terlibat secara langsung atau tidak langsung dalam menyiapkan projek ini.



ABSTRAK

Kajian ini dijalankan bagi menentukan sebatian perisa meruap dalam produk coklat, iaitu coklat gelap, coklat susu dan coklat putih. Sebatian perisa diekstrak dengan menggunakan kaedah pengekstrakan penyulingan stim dan dianalisis dengan kromatografi gas – pengesan pengionan nyala. Hasil daripada kajian ini menunjukkan sebatian pirazina contohnya 2,3-dimetil pirazina, 2,5-dimetil pirazina dan 2,6-dimetil pirazina tidak dikesan di dalam ekstrak sampel-sampel coklat yang dikaji.



***STUDY OF VOLATILE FLAVOUR COMPOUNDS IN PRODUCTS OF
CHOCOLATE: GC-FID ANALYSIS***

ABSTRACT

This study was carried out to determine the volatile flavours in various products of dark chocolate, milk chocolate, and white chocolate samples. The flavour compounds were extracted using steam distillation extraction method, and analysed by Gas Chromatography – Flame Ionization Detector. The result showed that pyrazine compounds such as 2,3-dimethylpyrazine, 2,5-dimethylpyrazine and 2,6-dimethyl pyrazine were not detected in the extracts of chocolate samples.



ISI KANDUNGAN

	MUKA SURAT
HALAMAN JUDUL	i
PENGAKUAN	ii
PENGESAHAN	iii
PENGHARGAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
ISI KANDUNGAN	vii
SENARAI JADUAL	x
SENARAI RAJAH	xi
SENARAI FOTO	xiv
SENARAI LAMPIRAN	xv
SENARAI SIMBOL	xvi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Pengenalan	1
1.2 Taksonomi	3
1.3 Morfologi	4
1.3.1 Pokok	4
1.3.2 Daun	4
1.3.3 Bunga	4
1.3.4 Buah	5
1.4 Objektif kajian	5
1.5 Skop kajian	5



BAB 2	KAJIAN LITERATUR	6
2.1	Coklat	6
2.2	Pengelasan coklat	8
2.2.1	Coklat kosong	8
2.2.2	Coklat susu	8
2.2.3	Coklat putih	9
2.3	Pemprosesan koko	9
2.3.1	Pemprosesan primer	9
	a. Proses fermentasi	10
	b. Proses pengeringan	11
2.3.2	Pemprosesan sekunder	13
	a. Proses pemanggangan	13
2.3.3	Pemprosesan tertier	14
2.4	Pembentukan sebatian perisa dan aroma	16
2.4.1	Tindak balas Maillard	17
2.4.2	Sebatian pirazina	21
2.5	Kualiti biji dan produk koko	23
2.6	Khasiat coklat dan produk koko yang lain	26
BAB 3	BAHAN DAN KAEDAH	30
3.1	Penyediaan sampel	30
3.2	Kaedah analisis	31
3.2.1	Penentuan peratus kelembapan	31
3.2.2	Proses pengumpulan sebatian-sebatian perisa meruap	32
3.2.3	Pengekstrakan sebatian-sebatian perisa meruap	33



3.2.4	Proses pemekatan	34
3.2.5	Penentuan sebatian pirazina dalam coklat	35
a.	Kromatografi gas	35
b.	Penyediaan larutan piawai dan keluk kalibrasi	37
c.	Penentuan puncak	38
BAB 4	KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN	39
4.1	Peraturan kelembapan	39
4.2	Kromatogram larutan piawai pirazina	41
4.3	Kandungan sebatian pirazina dalam sampel coklat	45
4.4	Keluk kalibrasi	57
4.5	Perbandingan antara kandungan sebatian pirazina dalam ketiga-tiga jenis coklat	58
KESIMPULAN		61
RUJUKAN		62
LAMPIRAN		73



SENARAI JADUAL

		Muka surat
Jadual 3.1	Pembahagian sampel mengikut jenama dan jenis coklat yang berbeza	31
Jadual 3.2	Parameter kromatografi gas – pengesanan pengionan nyala (GC-FID)	37
Jadual 4.1	Peratusan kelembapan sampel coklat dan sampel kawalan	41
Jadual 4.2	Masa penahanan bagi setiap sampel	46



SENARAI RAJAH

		Muka surat
Rajah 2.1	Carta alir pemprosesan tertier	15
Rajah 2.2	Gambaran umum menunjukkan sebatian perisa sebagai hasil akhir (Boekel, 2006)	19
Rajah 2.3	Beberapa mekanisme laluan bagi pembentukan sebatian pirazina yang dicadangkan oleh Heath dan Reineccius (1986)	24
Rajah 2.4	Laluan metabolik pembentukan pirazina (Heath & Reneccius, 1986)	25
Rajah 2.5	Jumlah kandungan fenolik dan flavonoid dalam koko, teh hitam, teh hijau, dan wain merah, dinyatakan dalam miligram (mg) jumlah asid galik (GAE) dan jumlah epikatechin (ECE) untuk setiap hidangan masing-masing	28
Rajah 4.1	Kromatogram yang telah diperbesarkan bagi larutan piawai yang hanya mengandungi pelarut diklorometana	43
Rajah 4.2	Kromatogram yang telah diperbesarkan bagi larutan piawai 1000ppm 2,3-DMP	43
Rajah 4.3	Kromatogram yang telah diperbesarkan bagi larutan piawai 1000ppm 2,5-DMP	43
Rajah 4.4	Kromatogram bagi larutan piawai yang mengandungi 2,3-DMP, 2,5-DMP dan 2,6-DMP	44
Rajah 4.5	Perbandingan puncak di antara 2,3-DMP (biru), 2,5-DMP (coklat) dan 2,6-DMP (merah)	44
Rajah 4.6	Kromatogram yang telah diperbesarkan bagi larutan piawai 1000ppm 2,6-DMP	44
Rajah 4.7	Kromatogram bagi sampel Vochelle	47
Rajah 4.8	Kromatogram bagi sampel Vochelle yang telah diperbesarkan	47
Rajah 4.9	Kromatogram bagi sampel Van Houten	48



Rajah 4.10	Kromatogram bagi sampel Van Houten yang telah diperbesar	48
Rajah 4.11	Kromatogram bagi sampel Sovereign	49
Rajah 4.12	Kromatogram bagi sampel Sovereign yang telah diperbesar	49
Rajah 4.13	Kromatogram bagi sampel Cadbury Dream	50
Rajah 4.14	Kromatogram bagi sampel Cadbury Dream yang telah diperbesar	50
Rajah 4.15	Kromatogram bagi sampel Schogetten	51
Rajah 4.16	Kromatogram bagi sampel Schogetten yang telah diperbesar	51
Rajah 4.17	Kromatogram bagi sampel Milka	52
Rajah 4.18	Kromatogram bagi sampel Milka yang telah diperbesar	52
Rajah 4.19	Kromatogram bagi sampel Nona	53
Rajah 4.20	Kromatogram bagi sampel Nona yang telah diperbesar	53
Rajah 4.21	Kromatogram bagi sampel Beryl's Dark	54
Rajah 4.22	Kromatogram bagi sampel Beryl's Dark yang telah diperbesar	54
Rajah 4.23	Kromatogram bagi sampel Van Houten	55
Rajah 4.24	Kromatogram bagi sampel Van Houten yang telah diperbesar	55
Rajah 4.25	Kromatogram biji koko yang dipanggang	56
Rajah 4.26	Kromatogram biji koko yang dipanggang yang telah diperbesar	56
Rajah 4.27	Turutan puncak yang keluar apabila kolum polar digunakan	57
Rajah 4.28	Struktur sebatian pirazina disusun mengikut kopolaran yang meningkat	58



SENARAI FOTO

		Muka surat
Foto 1.1	Buah koko, <i>Theobroma cacao L.</i>	3
Foto 3.1	Pengekstrakan sebatian perisa dengan peralatan Likens dan Nickerson	33
Foto 3.2	Kromatografi gas – pengesanan pengionan nyala (GC- FID)	36



SENARAI LAMPIRAN

		Mukasurat
Lampiran 1	Beberapa kelas sebatian perisa yang diperolehi daripada tindak balas Maillard (Boekel, 2006)	72
Lampiran 2	Sebatian pirazina yang lazimnya dikesan (Arnoldi <i>et al.</i> , 1988)	73
Lampiran 3	Gambar bagi sampel coklat yang dikaji	75
Lampiran 4	Contoh pengiraan bagi penentuan peratus (%) kelembapan	78
Lampiran 5	Penyediaan larutan piawai	79



SENARAI SIMBOL

cm	sentimeter
%	peratus
ww ⁻¹	berat per berat
°C	degree Celcius
µm	mikrometer
µL	mikroliter
g	gram
mL	mililiter
ppm	part per million
<	kurang daripada
DMP	dimetilpirazina
gs ⁻¹	gram per saat



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Pengenalan

Coklat merupakan salah satu produk koko yang amat popular dan menjadi makanan kegemaran orang ramai pada masa kini. Disebabkan oleh aromanya yang menyenangkan dan rasanya yang menarik, biji koko yang telah difermentasi dan dipanggang menjadi kegemaran orang ramai sebagai bahan utama dalam minuman koko dan konfeksi coklat (Stark *et al.*, 2006).

Koko mula ditanam kira-kira 600 Tahun Masihi di Amerika Utara. Koko dibawa ke Eropah pada abad ke-16 dan selepas itu, koko tersebar luas ke merata dunia. Koko komersil adalah koko yang telah melalui proses fermentasi, pengeringan dan pemanggangan. Koko membentuk ramuan coklat yang paling penting di mana ia menyumbang kepada perisa coklat yang unik. Pada masa kini, keperluan global setiap tahun terhadap biji koko semakin meningkat untuk memenuhi permintaan dari serata dunia.



Perisa merupakan sebatian meruap yang sangat kompleks yang secara dasarnya terdiri daripada rasa dan aroma tetapi juga disertai oleh deria rasa dan respons terhadap suhu (Heath & Renciccius, 1986). Pelopor perisa coklat terbentuk semasa proses fermentasi dan proses pengeringan biji koko. Perisa diwujudkan oleh sebatian-sebatian kimia iaitu kumpulan pirazina, aldehid, keton, alkohol, ester dan beberapa sebatian beraroma yang lain (Suratnam, 2006).

Sebatian perisa coklat tidak terbentuk secara semulajadi tetapi ia harus dibentuk melalui tindakbalas primer perisa iaitu tindak balas Maillard. Tindak balas ini merupakan tindakbalas yang kompleks, di mana melibatkan pemecahan gula penurun dan sebatian amino (Hansen *et al.*, 1998). Selain daripada perisa yang dikehendaki, biji koko juga mengandungi perisa yang tidak dikehendaki seperti rasa pahit, kelat dan masam yang menjadi faktor kemerosotan kualiti. Rasa pahit dan kelat adalah disebabkan oleh kumpulan sebatian katechin dan tannin. Manakala rasa masam adalah disebabkan oleh asid asetik dan asid laktik. Katechin dan tannin terdapat secara semulajadi di dalam biji koko manakala asid terbentuk hasil aktiviti mikrob terhadap gula semasa fermentasi.

Biji koko dari sumber yang berlainan mempunyai perisa yang berlainan. Biji koko dari Afrika mempunyai perisa coklat yang berbeza dari koko di Malaysia, manakala biji koko dari klon yang berbeza juga mempunyai perisa yang berbeza (Jinap *et al.*, 1995; Suratnam, 2006). Pasaran berlainan memilih koko dari sumber berlainan untuk mendapatkan hasil yang dikehendaki. Untuk tujuan ini, pencampuran dilakukan bagi mendapatkan perisa yang diperlukan.



Di samping itu, perisa juga merupakan salah satu ciri kimia yang mempengaruhi kualiti coklat. Kualiti yang konsisten adalah penting bagi biji koko untuk diproses menjadi produk koko terutamanya coklat. Kualiti biji koko yang rendah akan menjejaskan industri coklat yang mempunyai pasaran yang besar terutama di Eropah. Oleh itu, semua proses yang terlibat di dalam industri koko dari peringkat penanaman hingga ke pemprosesan hiliran adalah mempunyai peranan yang sama penting untuk menentukan produk yang dikeluarkan adalah konsisten dan berkualiti tinggi.

1.2 Taksonomi

Biji koko mewakili benih kepada pokok koko tropika, *Theobroma cacao* L., daripada famili *Sterculiaceae*. Nama seperti 'Criollo' dan 'Forastero' merujuk kepada subspecies *Theobroma*, nama botani yang bermaksud "makanan bagi para dewa" (Pätzold & Brückner, 2006). Foto 1.1 menunjukkan buah koko, *Theobroma cacao* L..

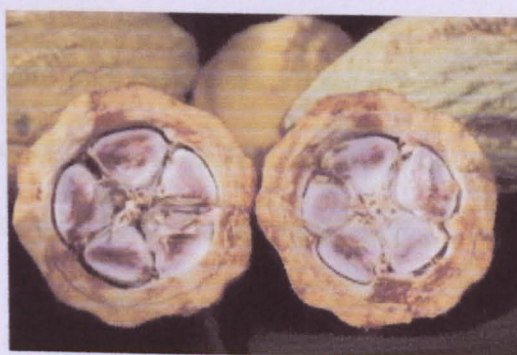


Foto 1.1: Buah koko, *Theobroma cacao* L.

1.3 Morfologi

1.3.1 Pokok

Koko adalah tanaman sara bersaiz sederhana. Tanaman ini boleh hidup lebih 25 tahun dan mencapai ketinggian 6-15 meter. Untuk penanaman komersil, koko dijaga pada ketinggian 1.5-2.0 meter. Pokok koko mengeluarkan dua jenis cabang yang dipanggil “Chupon” ketinggian pokok adalah melalui pertumbuhan ‘jourquete’.

1.3.2 Daun

Daun koko yang matang berukuran 37.8 cm panjang x 10.3 cm lebar. Daun matang berwarna hijau manakala ada sesetengah varieti berwarna kemerahan.

1.3.3 Bunga

Pokok koko mula berbunga pada umur 18 bulan hingga tiga tahun. Bunga yang dihasilkan adalah ‘hermoprodite’ yang terbit dari cabang yang matang. Kebiasaannya hanya 1-2% bunga membentuk buah. Koko pada kebiasaannya boleh berkeserasian sendiri atau tidak keserasian sendiri untuk pendebungaan.



1.3.4 Buah

Buah koko akan matang antara lima hingga enam bulan selepas pendebungaan. Saiz buah dan bentuk buah banyak bergantung kepada klon. Setiap buah koko mengandungi antara 30-50 biji koko yang dikelilingi oleh lendir manis. Buah kebiasannya berwarna hijau atau merah sebelum matang dan bertukar kuning sewaktu matang atau masak.

1.4 Objektif kajian

Objektif kajian ini adalah untuk mengenalpasti sebatian-sebatian perisa meruap yang ada dalam pelbagai jenama dan pelbagai jenis coklat.

1.5 Skop kajian

Dalam kajian ini, sebatian perisa daripada tiga jenis coklat iaitu: coklat susu, coklat gelap dan coklat putih, daripada tiga jenama yang berlainan akan dianalisis. Kaedah pengekstrakan sebatian perisa meruap menggunakan kaedah pengekstrakan penyulingan stim (*Steam Distillation Extraction*) dengan menggunakan peralatan Likens dan Nickerson. Hasil ekstrak akan dipekatkan lagi dengan menggunakan peralatan Vigraux sebelum disuntik ke dalam kromatografi gas – pengesan pengionan nyala (*Gas Chromatography – Flame Ionization Detector*).

BAB 2

KAJIAN LITERATUR

2.1 Coklat

Coklat, suatu emulsi yang kompleks, merupakan makanan mewah yang mana semasa pengambilannya boleh membangkitkan suatu julat rangsangan yang dapat mengaktifkan pusat kepuasan dalam otak manusia. Coklat juga ditakrifkan sebagai produk homogenus yang diperolehi daripada pemprosesan satu atau lebih daripada bahan-bahan berikut: likur koko, lemak koko, serbuk koko termasuk serbuk kurang lemak, mempunyai atau tidak mempunyai ramuan pilihan yang dibenarkan dan, atau agen perasa (Afoakwa *et al.*, 2007).

Coklat dikenali sebagai makanan yang kaya dengan sumber lemak dan sukrosa. Walau bagaimanapun, apabila kandungan lemak menjadi terlalu rendah (di bawah 27% ww^{-1}), coklat kehilangan kelembutannya dan kebolehan coklat mencair di dalam mulut juga terencat (Nebesny *et al.*, 2005). Coklat diperbuat daripada pelbagai jenis resepi dan mengandungi bahan tambahan dalam produk-produk koko yang lain.



Justeru, nilai nutrisinya akan berlainan bergantung kepada bahan-bahan dalam produk-produk tersebut (Moros *et al.*, 2007).

Coklat diperbuat daripada pelbagai resipi yang berlainan dan mengandungi bahan tambahan yang menyumbang kepada produk koko. Justeru itu, kandungan nutrisinya akan berbeza bergantung kepada bahan-bahannya. Contohnya, coklat kosong mempunyai kandungan pepejal koko yang tinggi dan seterusnya akan mengekalkan kebanyakan khasiat yang ada pada koko berbanding dengan coklat susu yang mana mempunyai kandungan pepejal koko yang lebih rendah. Coklat susu pula mengandungi susu dan susu kaya dengan protein oleh itu kandungan proteinnya lebih tinggi berbanding dengan coklat gelap (Afoakwa *et al.*, 2007).

Pepejal koko berasal daripada biji koko yang diperolehi daripada buah koko, *Theobroma cacao*, dengan pengeluaran dunia didominasi oleh jenis *Forastero*, yang dibentuk daripada biji yang kecil, berwarna ungu dan leper. Jenis yang lain, *Criollo*, yang mana pengeluarannya sangat sedikit ; *Trinitario*, hibrid *Criollo* dan *Forastero* yang tahan penyakit, dianggap sebagai biji yang boleh menyumbang kepada rasa (Afoakwa *et al.*, 2007).



2.2 Pengelasan coklat

Kategori coklat yang utama adalah coklat gelap, coklat susu dan coklat putih di mana kesemua jenis coklat ini berbeza dari segi kandungan pepejal koko, lemak susu dan lemak koko. Hasilnya ialah nisbah karbohidrat, lemak dan protein yang berlainan (Afoakwa *et al.*, 2007).

2.2.1 Coklat gelap

Coklat gelap merupakan resipi coklat yang paling ringkas. Coklat jenis ini ialah coklat tanpa susu sebagai bahan tambahan. Bahan utama dalam coklat gelap ialah likur koko, lemak koko, gula dan vanila. Coklat gelap berbeza dengan coklat susu kerana serbuk susu tidak digunakan.

2.2.2 Coklat susu

Coklat yang paling dikenali ramai ialah coklat susu, yang mana coklat ini mengandungi serbuk susu atau susu cair. Campuran koko dan rasa susu yang unik menjadikan coklat susu sebagai salah satu produk yang sangat popular di serata dunia. Selain komponen penting susu itu sendiri seperti lemak, protein, laktosa, dan mineral, susu turut mengandungi campuran bahan lain yang mempunyai nilai pemakanan yang tinggi seperti vitamin, unsur surih dan sumber nitrogen tanpa protein.



Rujukan

- Afoakwa, E.O., Paterson, A., and Fowler, M. 2007. Factors influencing rheological and textural qualities in chocolate - a review. *Journal of Trends in Food Science and Technology*:1-9.
- Ali, A., Selamat, J., Man, Y.B.C., and Suria, A.M. 2001. Effect of storage temperature on texture, polymorphic structure, bloom formation and sensory attributes of filled dark chocolate. *Journal of Food Chemistry* 72: 491-497.
- Ames, J.M. 1990. Control of Maillard reaction in food systems. *Journal of Trends in Food Science & Technology* 1: 150-154.
- Arnoldi, A., Arnoldi, C., Baldi, O., and Griffini, A. 1988. Flavor components in the Maillard reaction of different amino acids with fructose in cocoa butter-water. Qualitative and Quantitative Analysis of Pyrazines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36: 988-992.
- Baigrie, B.D. and Rumbelow, S.J. 1987. Investigation of flavour defects in Asian cocoa liquors. *Journal of Science and Food Agriculture* 39: 357-368.
- Bell, L.N. 1997. Maillard reaction as influenced by buffer type and concentration. *Journal of Food Chemistry* 59(1): 143-147.
- Benjakul, S., Lertittikul, W., and Bauer, F. 2005. Antioxidant activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein-sugar model system. *Journal of Food Chemistry* 93(2): 189-196.
- Biehl, B., Brunner, E., Passern, D., Quesnel, V.C., and Adomako, D. 1985. Acidification, proteolysis and flavour potential in fermenting cocoa beans. *Journal of Science and Food Agriculture* 36: 583-598.



- Boekel, M.A.J.S.v. 2006. Formation of flavour compounds in the Maillard reaction. *Journal of Biotechnology Advances* **24**(2): 230-233.
- Bolenz, S., Thiessenhusen, T., and Schape, R. 2003. Fast conching for milk chocolate. *Journal of Food Technology* **218**: 62-67.
- Bonvehí, J.S. 2005. Investigation of aromatic compounds in roasted cocoa powder. *Eur Food Res Technol* **221**: 19-29.
- Brito, E.S.d., GARCÍA, N.H.P., and AMÂNCIO, A.C. 2002. Effect of polyphenol oxidase(PPO) and air treatments on total phenol and tannin content of cocoa nibs. *Ciênc Tecnol Aliment, Campinas* **22**(1): 45-48.
- Bunko, K. 2007. Book reviews: The Maillard Reaction: Chemistry, Biochemistry and Implications. *International Journal of Biological Macromolecules* **41**: 358-359.
- Cai, J., Liu, B., and Su, Q. 2001. Comparison of simultaneous distillation extraction and solid-phase microextraction for the determination of volatile flavor components. *Journal of Chromatography A* **930**: 1-7.
- Cooper, K.A., Campos-Gimenez, E., Alvarez, D.J., Nagy, K., Donovan, J.L., and Williamson, G. 2007. Rapid reversed phase Ultra-Performance Liquid Chromatography Analysis of the major cocoa polyphenols and inter-relationships of their concentrations in chocolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 2841-2847.
- Counet, C., Callemien, D., and Collin, S. 2006. Chocolate and cocoa: New sources of trans-resveratrol and trans-piceid. *Journal of Food Chemistry* **98**: 649-657.



- Cros, E. 2000. Cocoa aroma; A review. In *13th International Cocoa Research Conference*, Kota Kinabalu, Malaysia.
- Dahiya, S., Karpe, R., Hegde, A.G., and Sharma, R.M. 2005. Lead, cadmium and nickel in chocolates and candies from suburban areas of Mumbai, India. *Journal of Food Composition and Analysis* **18**: 517-522.
- Engler, M.B. and Engler, M.M. 2004. The vasculoprotective effects of flavonoid-rich cocoa and chocolate *Journal of Nutrition Research* **24**(9): 695-706.
- Forss, D.A. 1969. Role of lipids in flavors. *Journal of International Flavors & Fragrances* **17**(4): 681-685.
- Frauendorfer, F. and Schieberle, P. 2006. Identification of the key aroma compounds in cocoa powder based on molecular sensory correlations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 5521-5529.
- Graaf, C.D., Legger, A., and Roozen, J.P. 1990. Anchored ratio scale values in the assessment of perceived sweetness, bitterness and chocolate flavour intensity in chocolate confetti and flakes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **50**(3): 363 - 375.
- Hansen, C.E., Olmo, M.d., and Burri, C. 1998. Enzyme Activities in Cocoa Beans During Fermentation. *Journal of Science Food Agriculture* **77**: 273-281.
- Hashim, L. and Chaveron, H. 1994. Extraction and determination of methylpyrazines in cocoa beans using coupled steam distillation-microdistillator *Journal of Food Research International* **27**(6): 537-544.
- Hashim, L., Hudiyono, S., and Chaveron, H. 1997. Volatile compounds of oxidized cocoa butter. *Journal of Food Research International* **30**(3/4): 163-169.



- Hashim, P., Selamat, J., Muhammad, K., and Ali, A. 1999. Effect of drying time, bean depth and temperature on free amino acid, peptide-N, sugar and pyrazine concentrations of Malaysian cocoa beans. *Journal of the Science Food Agriculture* **79**: 987-994.
- Hashim, P., Selamat, J., Muhammad, S.K.S., and Ali, A. 1998. Changes in Free Amino Acid, Peptide-N, Sugar and Pyrazine Concentration during Cocoa Fermentation. *Journal of Science Food Agriculture* **78**: 535-542.
- Heath, H.B. and Reineccius, G. 1986. *Flavor Chemistry and Technology*. MacMillan Publishers, Westport Connecticut.
- Heravi, M.J. and Sereshti, H. 2007. Determination of essential oil components of *Artemisia haussknechtii* Boiss. using simultaneous hydrodistillation-static headspace liquid phase microextraction-gas chromatography mass spectrometry *Journal of Chromatography A* **1160**,(1-2): 81-89.
- Hii, C.L., Samuel, Y.K.C., and Haslita, I.N. 2004. Quality assesment of cocoa beans produced by smallholders from different regions in Malaysia. *Malaysian Cocoa Journal* **1**: 53-58.
- Holm, C.S., Aston, J.W., and Douglas, K. 1992. The effects of the organic acids in cocoa on the flavour of chocolate. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **61**(1): 65 - 71.
- Jinap, S., Dimick, P.S., and Hollender, R. 1995. Flavour evaluation of chocolate formulated from cocoa beans from different countries. *Journal of Food Control* **6**(2): 105-110.



- Jousse, F., Jongen, T., Agterof, W., S.Russell, and Braat, p. 2002. Simplified kinetic scheme of flavor formation by the Maillard reaction. *Journal of Food Science* **67**(7): 2534-2542.
- Kennedy, J.F. and Knill, C.J. 1995. Book Review: Maillard Reactions in Chemistry, Food and Health. *Journal of Carbohydrate Polymers* **25**: 241-242.
- Kinta, Y. and Hatta, T. 2007. Composition, structure, and color of fat bloom due to the partial liquefaction of fat in dark chocolate. *Journal of American Oil Chemical Society* **84**: 107-115.
- Krysiak, W. 2006. Influence of roasting conditions on coloration of roasted cocoa beans. *Journal of Food Engineering* **77**: 449-453.
- Labbe, D., Damevin, L., Vaccher, C., Morgenegg, C., and Martin, N. 2006. Modulation of perceived taste by olfaction in familiar and unfamiliar beverages. *Journal of Food Quality and Preference* **17** 582-589.
- Lachenaud, P., D. Paulina, M.D., and Thevenin, J.-M. 2007. Twenty years of agronomic evaluation of wild cocoa trees (*Theobroma cacao* L.) from French Guiana *Journal of Scientia Horticulturae* **113**(4): 313-321.
- Lee, K.W., Kim, Y.J., Lee, H.J., and Lee, C.Y. 2003. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 7292-7295.
- Lewis, M. 1996. Maillard reactions in chemistry, food and health. *Journal of Trends in Food Science & Technology* **7**: 31.
- Lipp, M. and Anklam, E. 1998. Review of cocoa butter and alternative fats for use in chocolates - Part A. Compositional data. *Journal of Food Chemistry* **62**(1): 73-97.



- Lopez, A. and Quesnel, V.C. 1973. Volatile fatty acid production in cacao fermentation and the effect on chocolate flavour. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **24**(3): 319 - 326.
- Luna, F., Crouzillat, D., Cirou, L., and Bucheli, P. 2002. Chemical composition and flavour of Ecuadorian cocoa liquor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 3527-3532.
- Macarthur, R., Crews, C., and Brereton, P. 2000. An improved method for the measurement of added vegetable fats in chocolate. *Journal of Food Additives and Contaminants* **17**(8): 653-664.
- Mamot, S. 1992. Quality of Malaysian Cocoa Beans. *Lembaga Koko Malaysia* 1-12.
- Martins, S.I.F.S., Jongen, W.M.F., and Boekel, M.A.J.S.v. 2001. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Journal of Trends in Food Science & Technology* **11**: 364-373.
- Misnawi, Jinap, S., Jamilah, B., and Nazamid, S. 2004. Sensory properties of cocoa liquor as affected by polyphenol concentration and duration of roasting *Journal of Food Quality and Preference* **15**(5): 403-409.
- Misnawi, Jinap, S., Nazamid, S., and Jamilah, B. 2002. Activation of remaining key enzymes in dried under-fermented cocoa beans and its effect on aroma precursor formation. *Journal of Food Chemistry* **78**: 407-417.
- Misnawi, Selamat, J., Bakar, J., and Saari, N. 2002. Oxidation of polyphenols in unfermented and partly fermented cocoa beans by cocoa polyphenol oxidase and tyrosinase *Journal of the Science of Food and Agriculture* **82**(5): 559-566.



- Misnawi, S., Jinap, Jamilah, B., and Nazamid, S. 2004. Effect of polyphenol concentration on pyrazine formation during cocoa liquor roasting. *Journal of Food Chemistry* **85**: 73-80.
- Moros, J., Inon, F.A., Garrigues, S., and Guardia, M.d.l. 2007. Near-infrared diffuse reflectance spectroscopy and neural networks for measuring nutritional parameters in chocolate samples. *Journal of Analytica Chimica Acta* **584**: 215-222.
- Moulay, L., Manzanares, P., and Vallés, S. 2006. Effect of enzyme treatments and drying temperatures on methypyrazine content in cocoa(*Theobroma Cacao L.*) powder extract. *Journal of Food Science* **71**(9): 621-625.
- Muresan, S., Eillebrecht, M.A.J.L., deRijk, T.C., Jonge, H.G.d., Leguijt, T., and Nijhuis, H.H. 2000. Aroma profile development of intermediate chocolate products I. Volatile constituents of block-milk. *Journal of Food Chemistry* **68**: 167-174.
- Mursu, J., Voutilainen, S., Nurmi, T., Rissanen, T.H., Virtanen, J.K., Kaikkonen, J., Nyssonen, K., and Salonen, J.T. 2004. Dark chocolate consumption increases HDL cholesterol concentration and chocolate fatty acids may inhibit lipid peroxidation in healthynhumans. *Journal of Free Radical Biology and medicine* **37**(9): 1351-1359.
- Nakamura, S. 2003. Book review: The Maillard reaction. *Journal of Food Research International* **36**: 303.
- Nebesny, E., zyzelewicz, D., Motyl, I., and Libudzisz, Z. 2005. Properties of sucrose-free chocolates enriched with viable lactic acid bacteria. *Eur Food Res Technol* **220**: 358-362.



- Nielsen, D.S., Teniola, O.D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T.S., and Holzapfel, W.H. 2007. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology* **114** 168–186.
- Nursten, H.E. 1981. Recent developments in studies of the maillard reaction *Journal of Food Chemistry* **6**(3): 263-277.
- Pajin, B. and Jovanovic, O. 2005. Influence of high-melting milk fat fraction on quality and fat bloom stability of chocolate. *Journal of Food Technology* **220**: 389–394.
- Pätzold, R. and Brückner, H. 2006. Gas chromatographic determination and mechanism of formation of D-amino acids occurring in fermented and roasted cocoa beans, cocoa powder, chocolate and cocoa shell. *Journal of Amino Acid* **31**: 63–72.
- Peng, F., Sheng, L., Liu, B., Tong, H., and Liu, S. 2004. Comparison of different extraction methods: steam distillation, simultaneous distillation and extraction and headspace co-distillation, used for the analysis of the volatile components in aged flue-cured tobacco leaves. *Journal of Chromatography A* **1040** 1–17.
- Perego, P., Fabiano, B., Cavicchioli, M., and Borghi, M.D. 2004. Cocoa quality and processing: a study by solid-phase microextraction and gas chromatography analysis of methylpyrazines. *Food and Bioproducts Processing* **84**(C4): 291–297.
- Plumas, B., Hashim, L., and Chaveron, H. 1996. Measurement of the olfactive intensity of chocolates by differential olfactometry. *Journal of Food Control* **7**(3): 117-120.
- Rawat, R., Gulati, A., Babu, G.D.K., Acharya, R., Kaul, V.K., and Singh, B. 2007. Characterization of volatile components of Kangra orthodox black tea by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Food Chemistry* **105**: 229–235.



- Redgwell, R.J., Trovato, V., and Curti, D. 2003. Cocoa bean carbohydrates: roasting-induced changes and polymer interactions. *Journal of Food Chemistry* **80**: 511–516.
- Reineccius, G.A., Keeney, P.G., and Weissberger, W. 1972. Factors affecting the concentration of pyrazines in cocoa beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **20**(2): 202-206.
- Rizzi, G.P. and Bunke, P.R. 1998. The use of roasting kinetics data to characterize natural and artificial chocolate aroma precursors. *Journal of Developments in Food Science* **40**: 535-546.
- Rohan, T.A. 1958. Processing of raw cocoa. II. - Uniformity in heap fermentation and development of methods for rapid fermentation of west african amelonado cocoa. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **9**(9): 542 - 551.
- Rohan, T.A.. 1963. Precursors of chocolate aroma. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **14**(11): 799 - 805.
- Rohan, T.A. and Stewart, T. 1967. The precursor of chocolate aroma : production of free amino acids during fermentation of cocoa beans. *Journal of Food Science* **32**: 395-398.
- Rošćić, M. and Horvat, Š. 2006. Transformations of bioactive peptides in the presence of sugars—Characterization and stability studies of the adducts generated via the Maillard reaction. *Journal of Bioorganic & Medicinal Chemistry* **14**: 4933–4943.



- Salina A.R. 2001. *Kesan suhu dan masa yang berbeza terhadap pembentukan sebatian-sebatian pirazina semasa pemanggangan biji koko*. Disertasi Sarjana Muda Sains, Universiti Malaysia Sabah, Kota Kinabalu (Tidak diterbitkan).
- Sakharov, I.Y. and Ardila, G.B. 1999. Variations of peroxidase activity in cocoa(*Theobroma cacao* L.) beans during their ripening, fermentation and drying. *Journal of Food Chemistry* **65**: 51-54.
- Sanagi, M.M., Hung, W.P., and Yasir, S.M. 1997. Supercritical fluid extraction of pyrazines in roasted cocoa beans effect of pod storage. *Journal of Chromatography A* **785**: 361-367.
- Schawn, R.F. and Wheals, A.E. 2004. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Journal of Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **44** (4): 205-221.
- Schenk, H. and Peschar, R. 2004. Understanding the structure of chocolate. *Journal of Radiation Physics and Chemistry* **71**: 829-835.
- Shipar, M.A.H. 2006. Formation of pyrazines in dihydroxyacetone and glycine Maillard reaction: A computational study. *Journal of Food Chemistry* **98** (3): 403-415.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., and Nieman, T.A. 1998. *Principles of Instrumental Analysis*. Saunders College Publishing, US.
- Skoog, D.A., West, D.A., Holler, D.M., and Crouch, F.J. 2004. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Thompson, US.



- Stark, T., Bareuther, S., and Hoffman, T. 2006. Molecular definition of the taste of roasted cocoa nibs(*Theobroma cacao*) by means of quantitative studies and sensory experiment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 5530-5539.
- Stephan, A., Bücking, M., and Steinhart, H. 2000. Novel analytical tools for food flavours. *Food Research International* **33**: 199-209.
- Summa, C., Raposo, F.C., McCourt, J., Scalzo, R.L., Wagner, K.-H., Elmadfa, I., and Anklam, E. 2006. Effect of roasting on the radical scavenging activity of cocoa beans. *Eur Food Res Technol* **222**: 368–375.
- Suratnam, H.J. 2006. Kualiti dan keselamatan biji koko dan produk koko. In *Kursus penggredan Biji Koko Kering 2006 [bukan penggred]*. Lembaga Koko Malaysia, Tawau.
- Tian, H.Y., Zhang, J., Sun, B.G., Huang, M.Q., Li, J.R., and Han, X.X. 2007. Preparation of natural isovaleraldehyde by the Maillard reaction. *Journal of Chinese Chemical Letters* **18**: 1049–1052.
- Voigt, J., Biehl, B., Heinrichs, H., Kamaruddin, S., Marsoner, G.G., and Hugi, A. 1994. In-vitro formation of cocoa specific aroma precursor: aroma-related peptides generated from cocoa seed protein by co-operation of an aspartic endprotease and a carboxypeptidase. *Food Chemistry* **49**: 173-180.
- Wollgast, J. and Anklam, E. 2000. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Journal of Food Research International* **33**: 423-447.

