

THE ISOMERIZATION AND OXIDATION OF CAROTENOID COMPOUNDS IN THE OIL PALM FRUIT DURING PRODUCTIONS OF CPO

Isomerisasi dan Oksidasi Senyawa Karotenoid dalam Buah Kelapa Sawit Selama Pengolahan CPO

Reni Subawati Kusumaningtyas^{1,2} and Leenawaty Limantara^{3*}

¹ Magister Biology, Universitas Kristen Satya Wacana, Jl. Diponegoro 52-60 Salatiga 50711

² SMART Research Institute, Jl. Teuku Umar 19 Pekanbaru, Riau 28112

³ Ma Chung Research Center for Photosynthetic Pigment, Univ. Ma Chung, Malang 65151

Received May 14, 2008; Accepted March 3, 2009

ABSTRACT

Isomerization and oxidation have been known as the major factors of the degradation of carotenoid compounds. Results showed that the isomerization of the carotenoid in the oil palm fruit, during the sterilization process, promotes the decrease of the concentration of *trans* α - and *trans* β -carotene approximately 21 and 8%. The decrements have continued on the fruit digestion, pressing, and clarification processes. The isomerization is also indicated by the decreasing of the main peak spectra absorption intensity of α - and β -carotene about $\pm 10,4\%$. The spectra showed hypsochromic shift by ± 3 nm. On the other hand, the oxidation of carotenoid has occurred in all steps of crude palm oil (CPO) production. The oxidation of α -carotene has caused the increasing amount of lutein: 49% of fruit after sterilization process (BSt), 57% of crude oil after pressing (MSK), 17% of oil expurifier (MPF), and 5% of CPO product. The oxidation of β -carotene will increase the amount of zeaxanthin: 53% of fruit after sterilization process (BSt), 9% of crude oil after pressing (MSK), and 4% of oil expurifier (MPF).

Keywords: Isomerization Carotenoid, oxidation Carotenoid, oil palm

PENDAHULUAN

Minyak sawit (CPO: *crude palm oil*) dikenal sebagai salah satu sumber karotenoid [1]. Konsentrasi karotenoid dalam CPO menjadi salah satu penentu kualitasnya. Beberapa importir menetapkan batas minimum kandungan karotenoid dalam CPO yaitu ≥ 500 ppm, bahkan India sebagai negara importir terbesar menetapkan sebanyak ± 700 ppm.

Pada dasarnya kandungan karotenoid total dalam buah kelapa sawit diketahui sebesar 630-700 ppm [2], sedangkan Sundram [3] melaporkan sebesar 700-800 ppm. Namun, kandungan karotenoid tersebut mengalami penurunan selama proses pengolahan. Konsentrasi karotenoid dalam produk CPO rata-rata hanya sebesar 500 ppm. Diduga sejumlah karotenoid mengalami degradasi selama proses pengolahan CPO berlangsung [3].

Mekanisme degradasi dapat terjadi melalui proses isomerisasi maupun oksidasi. Isomerisasi menyebabkan terjadinya perubahan struktur geometris senyawa karotenoid dari bentuk *trans* menjadi bentuk *cis*. Berbeda dengan isomerisasi, terjadinya oksidasi akan menyebabkan karotenoid termodifikasi dan membentuk epoksi-epoksinya, yaitu berupa mono- dan di-oksigenasi karotenoid yang memiliki berat molekul lebih tinggi [4,5]. Bentuk-bentuk epoksi tersebut dapat terdegradasi

menjadi senyawa baru dengan berat molekul yang lebih rendah daripada bentuk epoksinya [5].

Menurut Tay dan Choo [6,7], pemanasan merupakan salah satu faktor penyebab isomerisasi senyawa karotenoid. Dalam pengolahan CPO, pemanasan merupakan aktifitas yang sangat vital dan mempengaruhi hasil ekstraksi minyak. Selama proses sterilisasi pemanasan dilakukan hingga suhu *sterilizer* mencapai 142,9 °C. Pada proses pembantingan buah, pelumatan, ekstraksi minyak, klarifikasi, dan purifikasi suhu dipertahankan 88-90 °C [8]. Tahapan proses pengolahan selanjutnya adalah melalui pengeringan vakum (*vacuum drying*) untuk menurunkan kadar air produk CPO.

Identifikasi senyawa-senyawa karotenoid dan produk degradasinya dapat dilakukan dengan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) yang dilengkapi dengan detektor *photodiode array* (PDA). Metode ini mampu menunjukkan komposisi senyawa-senyawa karotenoid dalam sebuah kromatogram [7]. Kombinasi antara data komposisi karotenoid dan hasil analisis kandungan karotenoid total yang dilakukan dengan metode PORIM 1995 [9] menghasilkan informasi mengenai kandungan setiap senyawa karotenoid dalam produk utama maupun produk samping pengolahan CPO.

* Corresponding author. Tel/Fax : +62-341-556400/550175
Email address : leenawaty.limantara@machung.ac.id

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang perubahan komposisi karotenoid akibat isomerisasi dan oksidasi selama pengolahan CPO dan menjadi dasar bagi penelitian-penelitian lanjutan yang bermanfaat untuk pengembangan produk kelapa sawit.

Penelitian dapat diarahkan pada pemanfaatan limbah-limbah yang banyak dihasilkan pabrik pengolahan kelapa sawit seperti janjang kosong dan serabut kelapa sawit. Pada pabrik dengan kapasitas olah 60 ton per hari, dapat dihasilkan janjang kosong dan serabut kelapa sawit masing-masing sebanyak 13,2 dan 5,7 ton (berat basah) per hari [8]. Adanya kandungan karotenoid dalam limbah pabrik pengolahan kelapa sawit ini merupakan potensi yang dapat dikembangkan menjadi produk-produk lain dengan nilai jual yang cukup tinggi. Secara komersial, karotenoid dimanfaatkan sebagai pewarna alami makanan, suplemen vitamin A, obat-obatan, dan kosmetik. Karotenoid juga dikenal sebagai bahan makanan tambahan yang baik untuk kesehatan dan banyak diminati oleh masyarakat.

METODE PENELITIAN

Penelitian terhadap senyawa karotenoid dilakukan mulai dari bahan baku (kelapa sawit), produk-produk antara dalam pengolahan CPO, hingga produk akhir CPO. Sampel-sampel tersebut meliputi buah segar (BS), buah steril (brondolan 1) pasca perebusan dan pembantingan/*thresing* (BSt), minyak sawit kasar pasca klarifikasi (MSK), minyak bersih dari tanki *purifier* (MPF), dan produk akhir yang telah dikurangi kadar airnya dengan *vacuum drier* (CPOvd). Pengambilan sampel dilakukan di salah satu pabrik pengolahan kelapa sawit yang terletak di kabupaten Siak, Provinsi Riau. Bahan kimia yang digunakan: aseton 100%, *n*-heksana, kalsium karbonat (CaCO₃) sebagai penetral, gas N₂ teknis, asetonitril anhidrat *grade* KCKT, diklormetana *grade* KCKT, isopropil alkohol *grade* KCKT, metanol 100% *grade* KCKT.

Prosedur Kerja

Ekstraksi karotenoid kasar [10,11]

Senyawa karotenoid dalam bahan diisolasi dalam larutan aseton 100%. Sampel diekstraksi dengan aseton 100% dengan perbandingan sampel dan pelarut 1 : 10 w/v. Pada waktu ekstraksi, sampel ditambahkan CaCO₃ sebagai agen penetral dan asam askorbat sebagai antioksidan untuk mencegah oksidasi. Ekstraksi dilakukan secepat mungkin untuk menghindari oksidasi dan degradasi enzimatik. Selanjutnya, ekstrak disaring dengan kertas saring, residu yang diperoleh diekstraksi

kembali dengan pelarut yang sama sampai semua pigmen terangkat.

Pemisahan lemak sampel

Lemak sampel perlu dipisahkan karena dapat menyebabkan kerusakan kolom. Proses pemisahan lemak dilakukan secara filtrasi pada suhu dingin. Ekstrak pekat karotenoid dalam aseton 100% diletakkan di dalam *freezer* bersuhu -20 °C selama 4 jam sehingga lemak-lemak dalam ekstrak akan menggumpal dan memisah dari karotenoid terlarut. Larutan karotenoid dalam aseton dipisahkan dengan filtrasi dan selanjutnya dipekatkan dengan menggunakan gas N₂.

Analisis komposisi karotenoid dengan kromatografi cair kinerja tinggi [7]

Komposisi karotenoid yang terdapat dalam sampel dianalisis menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) yang dilengkapi dengan detektor PDA pada panjang gelombang 222–800 nm. Metode analisis menggunakan metode yang dikembangkan oleh Yap dkk. [12], yaitu dengan sistem isokratik menggunakan kolom C18 RP (4.6 mm *i.d.* × 25 cm, 5 µm), dan campuran pelarut asetonitril : diklorometan (89 : 11 v/v) dengan laju alir 1 mL.min⁻¹

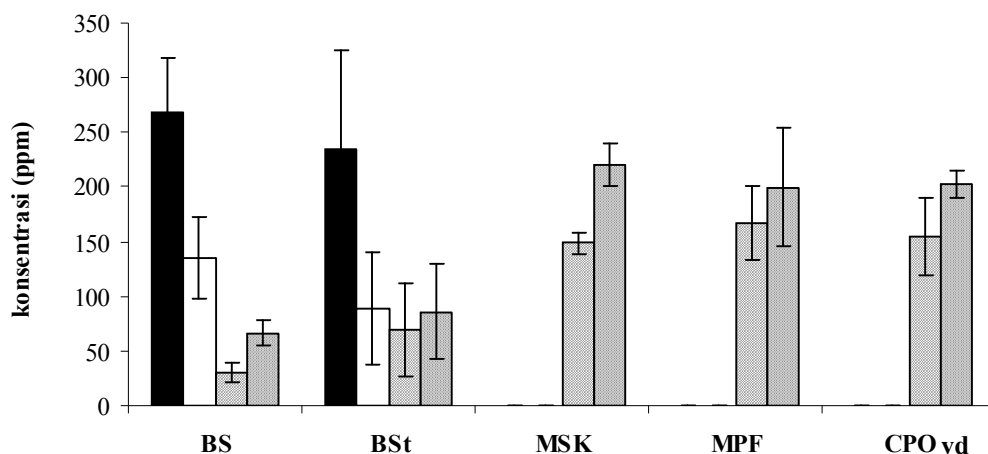
Data yang diperoleh dianalisis dengan program Matlab 6.5 untuk memperoleh grafik kromatogram KCKT dan melihat bentuk spektra masing-masing puncak yang muncul dalam kromatogram tersebut. Identifikasi senyawa karotenoid dilakukan pada puncak-puncak yang terbaca dalam grafik kromatogram KCKT. Kromatogram tersebut dipilih pada sinyal 444 nm dan 286 nm. Setiap puncak yang muncul identik dengan satu jenis senyawa karotenoid. Identifikasi jenis senyawa dilakukan berdasarkan panjang gelombang maksimum dari puncak-puncak spektra yang muncul.

Analisis kandungan karotenoid total

Metode yang dipergunakan dalam analisis kandungan karotenoid total mengacu pada metode PORIM 1995 [9]. Analisis dilakukan dengan cara mengekstrak sampel dengan *n*-heksana dalam labu ukur. Ekstrak yang diperoleh diukur absorbansinya pada panjang gelombang 446 nm. Konsentrasi karotenoid total dihitung dengan rumus:

$$C = \frac{p \times 383}{100 \times s} \times (a - b)$$

Keterangan: C = kandungan karotenoid total (ppm)
 p = pengenceran
 s = berat sampel (gram)
 a = absorbansi sampel
 b = absorbansi blanko



Gambar 1. Histogram perubahan konsentrasi *trans/cis* α - dan β -karoten selama proses pengolahan CPO. (■) *trans* β -karoten, (□) *trans* α -karoten, (⊗) *cis* β -karoten, (⊞) *cis* α -karoten, (BS) buah segar, (BSt) buah setelah perebusan, (MSK) produk setelah proses pengepresan, (MPF) produk setelah proses purifikasi, (CPOvd) produk setelah keluar dari *vacuum drier*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

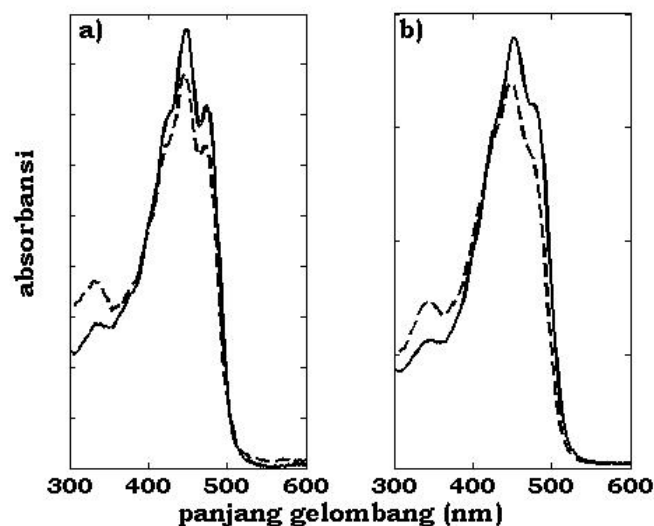
Proses pengolahan CPO yang selalu melibatkan pemanasan mengakibatkan sebagian karotenoid terdegradasi. Degradasi karotenoid selama proses pengolahan CPO terjadi melalui proses isomerisasi dan oksidasi.

Isomerisasi α - dan β -karoten

Struktur geometris molekul karotenoid dalam buah kelapa sawit segar (BS) lebih didominasi oleh bentuk *trans*. Dominasi tersebut ditunjukkan oleh tingginya konsentrasi *trans* α - dan β -karoten daripada *cis* α - dan β -karoten dalam BS (Gambar 1). Hasil analisis ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Lessin dkk. [13] dan Tay dkk. [14].

Struktur geometris tersebut mengalami perubahan selama proses pengolahan CPO. Perubahan terjadi melalui proses isomerisasi *trans* menjadi *cis*. Hasil isomerisasi terlihat dari peningkatan konsentrasi α - dan β -karoten dalam bentuk *cis* yang diimbangi dengan penurunan bentuk *trans*-nya. Peningkatan konsentrasi *cis* α - dan *cis* β -karoten terjadi mulai dari proses sterilisasi, yang terlihat pada kenaikan konsentrasinya dalam BSt, dan konsentrasinya mencapai maksimum pada MSK. Pada MSK tidak terdapat lagi α - dan β -karoten dalam bentuk *trans* (Gambar 1).

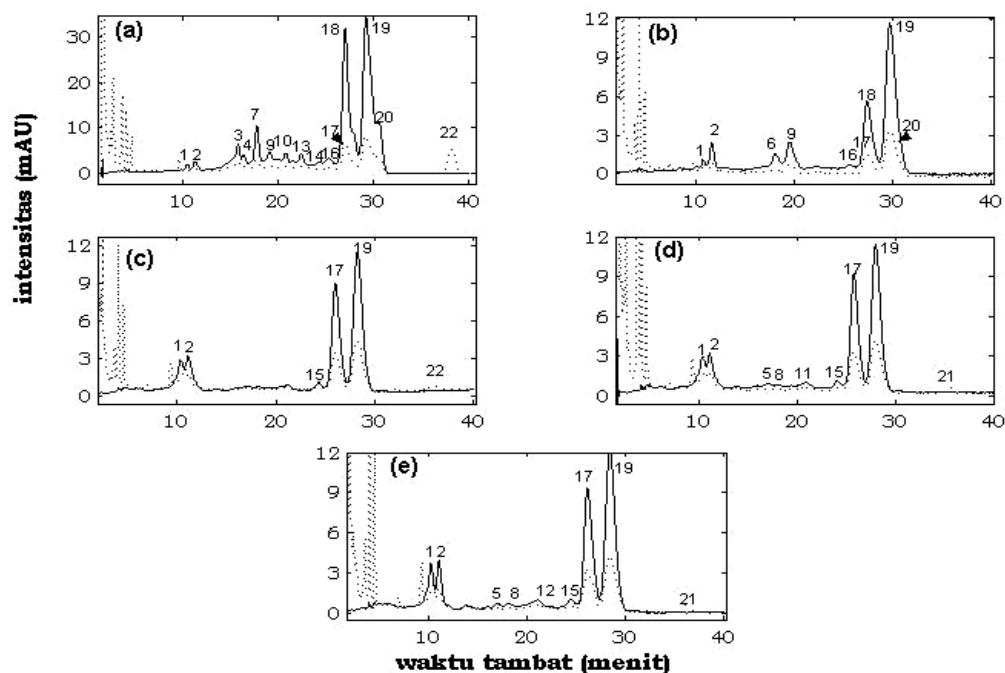
Tay dan Choo [7] menyatakan bahwa pemanasan merupakan salah satu faktor penyebab isomerisasi senyawa karotenoid. Proses pemanasan yang dilakukan dalam pengolahan CPO, baik untuk sterilisasi buah (142,9 °C) maupun untuk mempertahankan kondisi buah



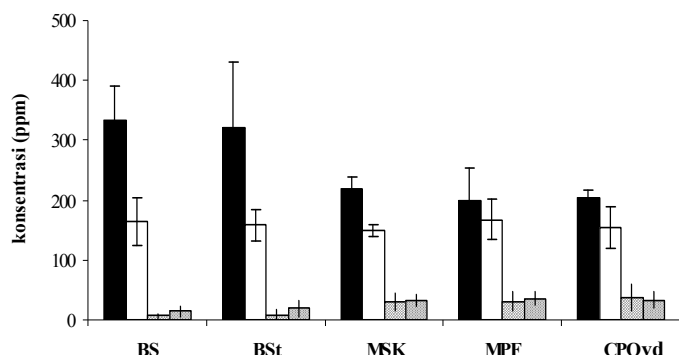
Gambar 2. Pola spektra PDA isomerisasi *trans* dan *cis* pada senyawa α dan β karoten: (a) α -karoten, (b) β -karoten, (—) bentuk *trans*, (---) bentuk *cis*

dan minyak pada suhu 88-90 °C saat pengepresan, klarifikasi, dan purifikasi, terbukti menyebabkan isomerisasi struktur molekul α - dan β -karoten dalam mesokarp buah kelapa sawit.

Terjadinya isomerisasi struktur molekul α - dan β -karoten dibuktikan dengan adanya perubahan pola spektra PDA (*photodiode array*) α -karoten (Gambar 2a) dan β -karoten (Gambar 2b). Pada spektra karotenoid bentuk *cis* terdapat puncak di daerah sinar ultraungu (daerah panjang gelombang (λ) 300-400 nm) [11]. Dalam penelitian ini puncak yang terbentuk pada λ 330 nm.



Gambar 3. Kromatogram KCKT senyawa karotenoid dalam produk-produk yang dihasilkan pada 5 tahap pengolahan CPO. (—) Hasil *scanning* pada 444 nm, (---) Hasil *scanning* pada 286 nm, (a) buah segar, (b) buah setelah perebusan, (c) produk paska proses pengepresan, (d) produk paska proses purifikasi, dan (e) produk CPO setelah keluar dari *vacuum drier*.



Gambar 4. Histogram konsentrasi empat senyawa karotenoid yang stabil selama proses pengolahan CPO: (■) β -karoten, (□) α -karoten, (▨) lutein, (▩) zeaxantin

Selain munculnya puncak di daerah sinar ultraviolet, perubahan struktur geometris dari *trans* ke *cis* juga ditandai dengan penurunan absorbansi di puncak utamanya dan pergeseran puncak utama secara hipsokromik (ke arah λ yang lebih kecil). Dalam penelitian ini terjadi pergeseran hipsokromik sejauh ± 3 nm dan penurunan absorbansinya $\pm 10,4\%$.

Perbandingan jumlah kandungan senyawa α - dan β -karoten dalam bentuk *trans* dan bentuk *cis* menunjukkan bahwa senyawa β -karoten memiliki stabilitas lebih baik dari pada senyawa α -karoten.

Stabilitas β -karoten ditunjukkan dengan penurunan konsentrasi bentuk *trans* pada proses sterilisasi (dari BS ke BSt) hanya sebesar 8%, sedangkan penurunan pada α -karoten mencapai 21%. Meskipun demikian, penurunan ini terus berlangsung dalam MST, MPF hingga pada CPOvd tidak terdapat lagi *trans* α - dan β -karoten. Menurut Dutta dkk. [15], isomerisasi geometris senyawa-senyawa karotenoid disebabkan karena ketidakstabilan rantai poliena dalam struktur molekulnya.

Senyawa karotenoid dalam bentuk *cis* diketahui juga memiliki stabilitas lebih rendah dibandingkan bentuk *trans* [16]. Rendahnya stabilitas senyawa karotenoid dalam bentuk *cis* ini mengakibatkan senyawa ini mudah teroksidasi pada proses pemanasan lebih lanjut.

Oksidasi senyawa-senyawa karotenoid

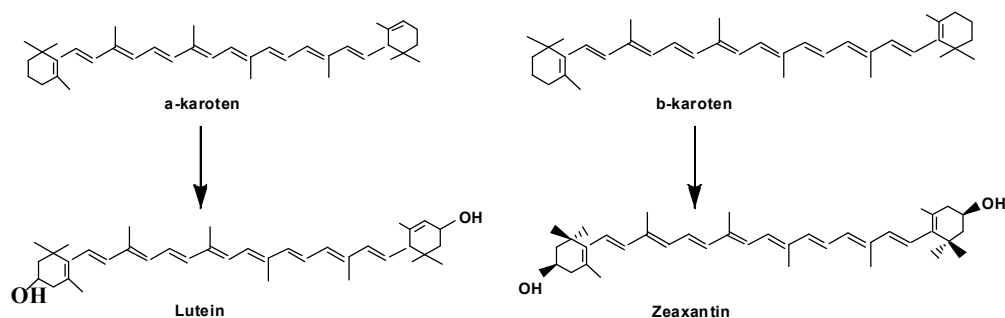
Peristiwa oksidasi senyawa-senyawa karotenoid selama proses pengolahan CPO terlihat dari perubahan pola kromatogram KCKT pada CPO dan produk-produk antaranya (Gambar 3). Perubahan pola kromatogram tersebut mencerminkan perubahan komposisi karotenoid (Tabel 1). Selama ini oksidasi dikenal sebagai penyebab utama terdegradasinya senyawa-senyawa karotenoid [17].

Tabel 1. Identifikasi karotenoid berdasarkan waktu tambat dan serapan maksimum

No	Waktu Tambat (min)	Identifikasi spektra*		λ max		Komposisi karotenoid (ppm)**					
						BS	BSt	MSK	MPF	CPO	
1	10,4	lutein	-	421	443	473	6,8	13,2	30,3	36,4	38,1
2	11,1	zeaxantin	-	425	452	472	14,1	30,0	33,0	34,4	34,3
3	15,8	belum teridentifikasi	299	421	442	463	10,3	-	-	-	-
4	16,4	belum teridentifikasi	-	422	446	471	8,4	-	-	-	-
5	16,9	α -zeakaroten	-	402	423	449	-	-	-	9,7	10,2
6	17,6	belum teridentifikasi	-	421	472	483	-	16,6	-	-	-
7	17,8	turunan zeaxantin	-	420	440	-	21,6	-	-	-	-
8	18,3	β -zeakaroten	-	408	429	451	-	-	-	9,7	6,3
9	19,1	δ -carotene	-	428	450	475	26,8	34,5	-	-	-
10	20,8	belum teridentifikasi	-	411	433	463	9,1	-	-	-	-
11	21,2	belum teridentifikasi	376	405	441	485	-	-	-	15,8	-
12	21,2	belum teridentifikasi	-	421	442	463	-	-	-	-	11,5
13	21,6	belum teridentifikasi	-	429	448	472	5,1	-	-	-	-
14	22,4	belum teridentifikasi	329	420	441	473	9,8	-	-	-	-
15	24,4	neurosporene	331	419	440	464	-	-	10,5	9,8	9,3
16	25,2	belum teridentifikasi	329	421	442	472	7,8	8,6	-	-	-
17	26,5	<i>cis</i> α -caroten	333	420	443	471	29,7	55,3	151,2	161,2	158,0
18	26,9	α -karoten	-	422	447	475	136,4	107,5	-	-	-
19	28,5	β -karoten	-	430	452	478	270,6	249,5	-	-	-
20	28,9	<i>cis</i> β -carotene	344	420	448	474	67,3	68,6	224,1	190,7	207,6
21	36,3	<i>cis</i> phitoen	250	278	288	298	-	-	-	7,5	8,5
22	38,1	phitoen		277	288	300	12,2	-	10,4	-	-

* identifikasi berdasarkan referensi Gross [11], Tay dan Choo [7], dan Rodriguez-Amaya [5]

** komposisi karotenoid ditentukan berdasarkan perbandingan luas puncak dari 4 ulangan

**Gambar 5.** Struktur senyawa α -karoten, β -karoten, lutein dan zeaxantin

Degradasi senyawa α - dan β -karoten ditandai dengan penurunan konsentrasi kedua pigmen ini dan peningkatan konsentrasi lutein dan zeaxantin (Gambar 4). Peningkatan konsentrasi lutein dan zeaxantin tersebut ditentukan berdasarkan persentase kenaikan konsentrasi lutein pada setiap produk antara dengan produk sebelumnya. Hasil analisis menunjukkan bahwa konsentrasi lutein semakin meningkat selama proses pengolahan hingga produk CPO. Persentase kenaikan lutein pada BSt, MSK, MPF dan CPOvd masing-masing sebesar 49, 57, 17 dan 5%. Berbeda dengan lutein, konsentrasi zeaxantin semakin meningkat pada proses

sterilisasi, pengepresan, dan mencapai maksimal pada proses purifikasi. Persentase kenaikan zeaxantin pada BSt, MSK dan MPF masing-masing sebesar 53, 9 dan 4%, sedangkan pada proses pengeringan minyak dalam *vacuum drier* konsentrasi zeaxantin relatif konstan.

Meskipun dikenal sebagai senyawa yang cukup stabil, pemanasan dan keberadaan oksigen selama proses pengolahan CPO mengakibatkan α - dan β -karoten teroksidasi dan membentuk senyawa turunannya. Senyawa tersebut dapat dideteksi dari kesamaan struktur molekulnya dengan struktur α - dan

β -karoten dan persamaan nama sistematisnya. Secara sistematis lutein disebut sebagai β,ϵ -carotene-3,3'diol, yaitu senyawa α -karoten (β,ϵ -carotene) yang mengikat 2 gugus OH di kedua cincinnya, sedangkan zeaxantin disebut sebagai β,β -carotene-3,3'diol yaitu senyawa β -karoten (β,β -carotene) yang mengikat 2 gugus OH di kedua cincinnya (Gambar 5). Dengan demikian lutein dan zeaxantin diduga merupakan produk degradasi α - dan β -karoten.

Dalam proses biosintesis karotenoid, α -karoten juga dikenal sebagai prekursor lutein [18,19] dan β -karoten merupakan prekursor zeaxantin [18]. Mekanisme biosintesisnya yaitu melalui hidroksilasi yang dipercepat dengan oksidasi. Menurut Gross [11], proses hidroksilasi tersebut dapat mengakibatkan penurunan konsentrasi β -karoten hingga 1-2%.

Diduga hidroksilasi dan oksidasi yang terjadi pada saat sterilisasi menyebabkan hilangnya beberapa senyawa karotenoid [3, 4, 7, 10, 13, 14] dan terdegradasinya senyawa α -, β -, dan δ -karoten dalam BS (Tabel 1). Degradasi δ -karoten diduga membentuk α -zeakaroten sebagai turunannya.

Selain lutein, zeaxantin dan α -zeakaroten juga ditemukan 2 jenis karotenoid baru yang diidentifikasi sebagai β -zeakaroten dan neurosporene. Keduanya diduga merupakan hasil degradasi karotenoid yang hilang sebelumnya. Selain membentuk senyawa lain, sebagian karotenoid juga mengalami kerusakan sehingga konsentrasi karotenoid total dalam produk menurun.

KESIMPULAN

Terjadinya isomerisasi pada senyawa α - dan β -karoten dalam buah kelapa sawit ditandai oleh perubahan struktur geometris dari *trans* ke *cis*, juga penurunan absorbansi spektra α - dan β -karoten $\pm 10,4\%$ di puncak utamanya dan pergeseran puncak utama secara hipsokromik ± 3 nm. Isomerisasi senyawa karotenoid selama proses pengolahan kelapa sawit menyebabkan penurunan konsentrasi *trans* α - dan β -karoten, yaitu sebanyak 21 dan 8% pada proses sterilisasi. Penurunan ini terus berlangsung pada proses pelumatan buah, pengepresan, dan klarifikasi. Proses oksidasi terjadi pada seluruh tahap pengolahan CPO. Oksidasi α -karoten menyebabkan kenaikan lutein sebesar 49, 57, 17 dan 5% pada BST, MSK, MPF dan CPOvd. Oksidasi β -karoten menyebabkan kenaikan zeaxantin sebesar 53, 9 dan 4% pada BST, MSK dan MPF.

DAFTAR PUSTAKA

1. Khosla, P., 2006, *Agro-food Industry by Tech.*, **17**, 21-23.
2. Zeb, A. and Mehmood, S., 2004, *Pakistan Journal of Nutrition*, **3**, 199-204.
3. Sundram, K., 2007, *Palm Oil: Chemistry and Nutrition Updates*, Malaysian Palm Oil Board (MPOB), Kuala Lumpur.
4. Fiedor, J., Fiedor, L., Winkler, J., Scherz, A., and Scheer, H., 2001, *Photochemistry and Photobiology*, **74** (1), 64-71.
5. Rodriguez-Amaya, D.B., 2001, *A Guide to Carotenoid Analysis in Food*, International Life Science Institute, Washington.
6. Tay, B.Y.P. and Choo, Y.M., 1999, *Journal of Oil Palm Research*, **2**, 62-78.
7. Tay, B.Y.P. and Choo, Y.M., 2000, *Palm Oil Development*, **33**, 13-17.
8. Naibaho, P., 1998, *Teknik Pengolahan Kelapa Sawit*, Pusat Penelitian Kelapa Sawit (PPKS), Medan.
9. Siew, W.L., Tang, T.S., and Tan, T.A., 1995, *PORIM Test Methods: Method of Test for Palm Oil and Palm Oil Products*, Palm Oil Research Institute of Malaysia, Kuala Lumpur.
10. Britton, G., Liaaen-Jensen, S., and Pfander, H., 1995, *Carotenoids Vol. 1A: Isolation and Analysis*, Birkhäuser Verlag, Boston.
11. Gross, J., 1991, *Pigmen in Vegetables: Chlorophylls and Carotenoids*, Van Nostrand Reinhold, New York.
12. Yap, S.C., Choo, Y.M., Ooi, C.K., Ong, A.S.H., and Goh, S.H., 1997, *Elaeis*, **3**, 309-378.
13. Lessin, W.J., Catigani, G.L., and Schwartz, S.J., 1997, *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 3728-3732.
14. Tay, B.Y.P., Choo, Y.M., Gwendoline, E.C.L., and Goh, S.H., 2002, *Journal of Oil Palm Research*, **13**, 23-32.
15. Dutta, D., Chaudhuri, U.R., and Chakraborty, R., 2005, *African Journal of Biotechnology*, **4**, 1510-1520.
16. Ladislav, F., Pacakova, V., Stulik, K., and Volka, K., 2005, *Current Analytical Chemistry*, **1**, 93-102.
17. Paiva, S.A.R. and Russell, R.M., 1999, *Journal of The American College of Nutrition*, **18**, 426-433.
18. Bauernfeind, J.C., 1972, *J. Agric. Food Chem.*, **20**, 456-473.
19. Tay, B.Y.P. and Gwendoline, E.C.L., 2006, *Journal of Oil Palm Research*, **18**, 189-197.