

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Pengertian Istilah Cokelat dan Kakao

Penggunaan istilah cokelat dan kakao sering meragukan. Banyak orang menyebut cokelat sebagai barang jadi, sebagai makanan atau minuman yang berasal dari chocolate. Kata chocolate ini telah berubah menjadi cokelat, yang mempunyai arti lebih luas daripada aslinya, yaitu dapat berarti pohon yang menghasilkan buah, tapi dapat pula berarti hasil yang sudah siap dikonsumsi. Sedangkan istilah kakao mempunyai arti pohon yang menghasilkan buah, buah serta biji yang dihasilkannya.⁽¹⁾

Pada masa sekarang ini untuk keseragaman sebutan, baik di Indonesia maupun di perdagangan Internasional sering menggunakan istilah kakao untuk menyebutkan pohon yang menghasilkan buah, buah serta biji yang dihasilkannya.⁽¹⁾

Berdasarkan hal tersebut maka untuk keperluan uraian-uraian pada tulisan ini penulis menggunakan istilah kakao untuk menyebut buah dan biji yang dihasilkan oleh tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.).

2.2. Asal-usul Tanaman Kakao

Tanaman kakao yang nama ilmiahnya *Theobroma cacao* L., bukanlah asli Indonesia. Tanaman ini berasal dari Amerika Tengah. Columbus yang datang ke tempat itu melihat kakao

digunakan sebagai mata uang oleh orang Indian. Cortez yang mengalahkan bangsa Astec tahun 1619 melihat orang Indian membuat minuman dari biji kakao. Orang Spanyol belum menyukai minuman yang oleh orang Indian dinamakan *chocolat* itu karena rasanya pahit.(2)

Biji kakao itu oleh Cortez dibawa ke Spanyol. Akhirnya bubuk cokelat yang diseduh dengan air panas dan gula itu sangat populer. Tetapi, minuman itu hanya dikonsumsi oleh para bangsawan dan hartawan saja karena harganya sangat mahal. Harga kakao mulai turun setelah tahun 1930 ditemukan mesin. Tetapi kemajuan pesat penggunaan kakao baru terjadi tahun 1928 setelah Van Houten berhasil menggilas biji kakao dan memisahkan lemak kakao dari bubuknya.(2)

Diperkirakan pada abad ke-18 tanaman kakao itu masuk ke Indonesia lewat Filipina dibawa oleh orang Spanyol. Bijinya berasal dari Venezuela dan Trinidad. Tanaman baru itu ditanam di Sangir Talaud. Pada tahun 1750 sudah ditemukan tanaman kakao di Sulawesi. Tanaman ini meluas dari Sulawesi ke Ternate dan Ambon. Kemudian menjalar ke arah barat, yakni ke Jawa Timur dan Jawa Tengah pada tahun 1806. Pada waktu itulah berdiri perkebunan kakao di Bedono, Tlogo, Getas dan Jatirunggo yang semuanya terletak di Jawa Tengah. Perkebunan serupa didirikan di Malang, Kediri dan Besuki, demikian juga di Jawa Barat yang berada di tanah Priangan dan sekitar Jakarta.(2)

2.3. Morfologi Tanaman Kakao

Morfologi tanaman kakao adalah sebagai berikut: Pohon kecil, yang kadang-kadang rendah sudah bercabang, tinggi 3-8 m.⁽⁶⁾ Sifat pertumbuhan "dimorphous" artinya dapat tumbuh secara vertikal yaitu batang utama tumbuh ke atas sampai setinggi 1 atau 2 m tanpa cabang.⁽⁷⁾

Daun bertangkai, bulat telur terbalik memanjang, meruncing, 10-48 kali 4-20 cm. Bunga berkelamin dua, berbilangan lima, dalam berkas di ketiak atau pada kayu yang tua. Daun kelopak bentuk lanset, panjang 6-8 mm, putih, kadang-kadang keunguan. Daun mahkota panjang 8-9 mm, kuku dari dalam dengan 2 rusuk merak, helaiannya menggantung, putih kuning atau kemerahan. Tabung benang sari bentuk periuk, tiap kali 2 benang sari yang seluruhnya bersatu, berseling dengan 1 staminodium. Staminodia ungu tua dengan ujung putih. Bakal buah beruang 5. Bakal biji banyak.⁽⁶⁾

Buah buni bentuk telur memanjang, dengan 5 pasang rusuk, ungu atau kuning, panjang 2-32 cm, dengan dinding tebal.⁽⁶⁾ Di dalam setiap buah terdapat 30 sampai 50 biji, tergantung pada jenis tanaman. Kulit buah mempunyai 10 alur dan tebalnya 1-2 cm.⁽⁸⁾

2.4. Klasifikasi dan Varietas-varietas Tanaman Kakao

2.4.1. Klasifikasi Tanaman Kakao

Klasifikasi tanaman kakao adalah sebagai berikut:

Divisio : Spermatophyta

Sub divisio	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Ordo	: Malvales
Famili	: Sterculeaceae
Genus	: <i>Theobroma</i>
Spesies	: <i>Theobroma cacao</i> L. (6)

2.4.2. Varietas-varietas Tanaman Kakao

Dua group dasar varietas kakao dengan daerah asal mereka yaitu Amerika Tengah dan Amerika Selatan dapat dikenali dengan mudah. (9)

Pertama adalah tipe Criollo yang merupakan kualitas superior, memiliki bentuk yang lebih panjang, pod berwarna merah atau kuning dengan kulit kayu yang relatif tipis, berisi, biji berwarna pucat. (9) Sifat yang lainnya adalah pucuk buah tumpul atau agak lancip, daun lebih kecil dari jenis-jenis yang lainnya, mempunyai 2-3 cabang lain dari jorquette, mudah terserang hama dan penyakit. (7)

Kedua adalah kakao tipe Forastero Amazona yang memiliki bentuk yang lebih keras, tumbuh secara tradisional di Brazil dan Afrika Barat. Forastero memiliki dinding sekeliling pod yang tebal, kuning ketika masak, biji berwarna violet. (9) Forastero juga mempunyai sifat lain seperti rasa biji kurang enak, daun lebih lebar, mempunyai 5 cabang jorquette, tidak mudah terserang hama dan penyakit. (7)

Ketiga adalah kakao tipe Trinitario dari Trinidad, yang merupakan jenis basteran dari tipe Criollo dan tipe Forastero⁽⁷⁾.

Kakao yang ada di Indonesia adalah kakao mulia ("edel") dan kakao lindak ("bulk"). Kakao mulia adalah kakao yang berasal dari tanaman kakao Criollo dan Trinitario serta hasil persilangannya. Kakao lindak adalah kakao yang berasal dari tanaman kakao Forastero.⁽¹⁰⁾

2.5. Kandungan Kimia Tanaman Kakao

Menurut Rohan (1963) dalam Rachman (1991), buah kakao terdiri dari empat bagian yaitu kulit, placenta, pulp dan biji. Buah kakao yang matang berisi 30-40 biji yang diselubungi pulp, sedangkan biji kakao terdiri dari dua bagian yaitu kulit biji dan keping biji. Komposisi kimia biji kakao non fermentasi dan fermentasi dapat dilihat pada tabel II.1. Sedangkan komposisi kimia kulit biji kakao fermentasi yang telah disangrai dapat dilihat pada tabel II.2.

Pulp biji kakao sebagian besar terdiri atas air dan sebagian kecil gula. Komposisi kimia pulp biji kakao disajikan pada tabel II.3.

Tabel II.1. Komposisi Fisika dan Kimia Biji Kakao Afrika Barat Non Fermentasi dan Fermentasi⁽¹¹⁾

Bahan	Biji Kakao	
	Non Fermentasi	Hasil Fermentasi
Kulit biji	9,630 %	10,740 %
Keping biji	89,600 %	88,560 %
Lemak	53,050 %	54,680 %
Air	3,650 %	2,130 %
Nitrogen		
Nitrogen terlarut	2,280 %	2,460 %
Nitrogen protein	1,500 %	1,340 %
Nitrogen amonia	0,028 %	0,042 %
Nitrogen amida	0,188 %	0,366 %
Theobromin	1,710 %	1,420 %
Kafein	0,085 %	0,066 %
Karbohidrat		
Glukosa	0,300 %	0,100 %
Sukrosa	-	-
Amilum	6,100 %	6,140 %
Pektin	2,250 %	4,110 %
Fiber	2,090 %	2,130 %
Selulosa	1,920 %	1,900 %
Pentosan	1,270 %	1,210 %
Tanin		
Asam tanat	2,240 %	1,990 %
Asam		
Asam asetat	0,014 %	0,136 %
Asam oksalat	0,290 %	0,300 %

Tabel II.2. Komposisi Kimia Kulit Kakao dari Kakao Fermentasi yang Telah Disangrai⁽¹¹⁾

Bahan	Persen
Air	3,80
Lemak	3,40
Nitrogen	
Nitrogen total	2,80
Nitrogen protein	2,10
Nitrogen amonia	0,04
Nitrogen amida	0,10
Theobromin	1,30
Kafein	0,10
Karbohidrat	
Sukrosa	-
Glukosa	0,10
Amilum	2,80
Pektin	8,00
Fiber	18,60
Selulosa	13,70
Pentosan	7,10
Tanin	
Aseton terlarut	1,80
Asam tanat	1,30
Asam	
Asam asetat (bebas)	0,10
Asam sitrat	0,70
Asam oksalat	0,32

Tabel II.3. Komposisi Kimia Pulp Biji Kakao⁽¹⁾

Bahan	Isi (%)
Air	80,00- 90,00
Albuminoid, bahan-bahan yang kelat	0,50- 0,70
Glukosa	8,00- 13,00
Sukrosa	0,40- 1,00
Pati	sedikit
Asam tak menguap	0,20- 0,40
Besi oksida	0,03
Garam-garam	0,40- 0,45

Pada biji kakao, kira-kira 12-18 % dari seluruh berat biji terdiri dari polifenol. Selain pada biji, polifenol juga terdapat pada jaringan yang lain.⁽⁴⁾ Distribusi senyawa fenolat dan alkaloid purin dapat dilihat pada tabel II.4.

Tabel II.4. Distribusi Senyawa Fenolat dan Alkaloid Purin dalam Jaringan *Theobroma cacao* L⁽¹²⁾

Jaringan	1 sianidin 3- α -L A- rabinosida	2 sianidin 3- β -D Ga- laktosida	3 Sianidin hidroklo- rida	4 Asam ferulat	5 Asam sinapat	6 Asam P- Kumarat	7 Kaemferol	8 Asam kafeat	9 Kuerse- tin	10 Asam P- Kumaril Kuinat
Getah kayu			++						+	
Jantung kayu			+							
Kulit kayu			++							
Akar			+					+++		
Batang hijau			+++			++		++		
Daun muda	+++	+	+++			+	+	+++	++	+++
Daun dewasa			++	++	++	+++		+++	+	+
Bunga (selu- ruhnya)	++	++	+++			++			+++	
Dinding pod- muda (bag. permukaan)	+++	+	+++			++		+	+++	
Dinding pod- muda (bag. dalam)			++			+++		+++	+	
Dinding pod- tua (bag. permukaan)	+		++	++				+	+	
Dinding pod- tua (bag.da- lam)			++			+		++	+	
Keping biji kakao	+++	+++	+++			+		++	+	+
Kulit kakao			+							

Tabel II.5. Distribusi Senyawa Fenolat dan Alkaloid Purin dalam Jaringan *Theobroma cacao* L (lanjutan)⁽¹²⁾

Jaringan	11 Epikatekin	12 Asam Klorogenat	13 Leukosianidin L1	14 Leukosianidin L2	15 Leukosianidin L3	16 Leukosianidin L4	17 Asam Neoklorogenat	18 Rutin	19 Theobromin	20 Kafein	21 Theophillin
Getah kayu	+	+	++	++	++						
Jantung kayu	+		+	+	+						
Kulit kayu	+		+	+	+						
Akar	+		+	+	+						
Batang hijau	++	+	++	++	+						
Daun muda	+++	+++	++	++	+			++			
Daun dewasa	+	+	+	+	+		++	++			
Bunga (seluruhnya)	+++		++	++	+						
Dinding pod-muda (bag. permukaan)	+++		+++	+++	++						
Dinding pod-muda (bag. dalam)	+		++	++	+						
Dinding pod-tua (bag. permukaan)	++		++	++	+						
Dinding pod-tua (bag. dalam)	+		+	+	+						
Keping biji kakao	+++		++	++	+	+++			+++	+	+
Kulit kakao	+		+		+						

2.6. Manfaat Tanaman Kakao

Tanaman kakao mempunyai kegunaan yaitu bijinya diolah menjadi cokelat, bubuk cokelat dan mentega cokelat.⁽⁶⁾ Selain itu bijinya dapat digunakan sebagai obat pusing, wasir, hipotensi, obat cacing dan perangsang saraf.⁽¹³⁾ Limbah kakao, baik kulit buah, maupun placenta bermanfaat untuk memberikan nilai tumbuh bagi kakao.⁽⁸⁾

2.7. Pengolahan Kakao

Panen kakao dimulai jika buah sudah masak, yang ditandai dengan berubahnya warna buah. Buah yang mula-mula berwarna hijau akan menjadi kuning jika masak dan yang semula merah akan menjadi oranye. Jika buah kurang masak, kadar gula dalam pulp (daging biji) kurang, yang mengakibatkan fermentasi kurang baik. Buah yang kelewat masak, biji-bijinya sering berkecambah, pulp sudah mengering dan aromanya kurang.⁽²⁾

Buah-buah yang telah dipetik tersebut kemudian dipecah. Pemecahan buah pada prinsipnya adalah memecahkan kulit buah dengan memukul secara langsung dengan alat pemukul kayu/pisau kemudian diambil bijinya. Yang harus diperhatikan adalah biji tak boleh pecah, tak boleh tersentuh logam, tak boleh kotor oleh tanah, karena ketiga hal tersebut dapat menurunkan kualitas biji kakao kering.⁽⁷⁾

Salah satu tahap pengolahan biji kakao yang terpenting adalah fermentasi. Tujuan fermentasi adalah, pertama,

menghilangkan daging biji (pulp) dengan bantuan aktivitas mikroorganisme. Kedua, agar terjadi perubahan kimiawi dalam keping biji, sehingga diperoleh kakao pasar yang dikehendaki.⁽⁷⁾

Setelah mengalami fermentasi, biji selanjutnya direndam dalam air selama \pm 3 jam. Perendaman dimaksudkan untuk menghentikan proses fermentasi. Selain itu perendaman juga bertujuan untuk mengurangi keasaman biji kakao kering dan memperbaiki warna kulit biji. Biji kakao kemudian dicuci dengan tujuan menghilangkan sisa-sisa pulp dan asam-asam yang ada. Keuntungan apabila biji dicuci, biji kering akan tahan terhadap jamur, hama dan penyimpanan. Tetapi apabila pencucian terlalu bersih akan mengakibatkan kerugian sebab dapat menaikkan persentase biji pecah dan menurunkan berat biji.⁽⁷⁾ Biji kakao Indonesia yang diolah oleh petani pada umumnya tidak dicuci.

Proses selanjutnya adalah pengeringan. Proses ini bertujuan untuk mengurangi kadar air dari biji sampai mencapai 4-6 % dan untuk mendapatkan warna kulit biji yang baik yaitu warna cokelat dan mengkilat serta merata. Pengeringan dapat dilakukan dengan 3 cara yaitu dijemur pada sinar matahari langsung (sundrying), menggunakan alat pengering buatan (artificial drying) dan kombinasi antara sundrying dan artificial drying.⁽⁷⁾

Proses akhir pengolahan kakao adalah sortasi dan penyimpanan. Sortasi biji yang telah dikeringkan dilaksanakan atas dasar berat biji, kemurnian, warna dan

bahan ikutan serta jamur. Sortasi biji dilakukan secara visual, dengan membuang biji-biji yang jelek dan rendah mutunya. Biji yang telah disortasi dimasukkan ke dalam karung goni. Penyimpanan selama 3 bulan di daerah tropis masih dapat mempertahankan mutu biji.⁽⁸⁾

2.8. Senyawa-Senyawa Polifenol dalam Tanaman Kakao

Polifenol merupakan komponen penting sebagian besar produk makanan agrikultural. Warna dan rasa yang menggigit berhubungan erat dengan polifenol.⁽³⁾

Pada biji kakao, kira-kira 12-18 % dari seluruh berat biji terdiri dari polifenol.⁽⁴⁾ Meskipun kebanyakan polifenol selama fermentasi dan pengeringan konsentrasinya menurun dengan cepat, mereka masih ada pada biji kakao dan menyumbang rasa menggigit dan pahit.^(4,5) Selama fermentasi, jumlah total senyawa fenol menurun sampai 70 %. Penurunan tajam dapat diamati antara hari kedua dan ketiga, ketika biji mati.⁽³⁾ Hal ini disebabkan ketika biji mulai memasuki fermentasi 24-28 jam (biji mati), polifenol berdifusi dari sel yang selanjutnya mengalami polimerisasi, oksidasi dan interaksi dengan protein.⁽⁴⁾

Sebagian besar polifenol kakao terdiri dari berjenis-jenis flavonoid seperti :

Antosianin

Menurut Forsyth (1952) dalam Williams (1971), ada dua antosianin mayor dan sejumlah kecil yang lain. Mereka

diperoleh dalam ekstrak metanol dari semua bagian tumbuhan kecuali kulit kayu, akar dan batang. Antosianin mayor adalah sianidin -3- α -L arabinosida dan sianidin -3- β -D Galaktosida. Pigmen minor belum diidentifikasi.

Antosianidin

Hanya satu antosianidin, yaitu sianidin hidroklorida, yang telah ditemukan. Ini diamati dalam hidrolisat asam dari semua bagian tumbuhan yang diuji. Aglikon ini diturunkan dari antosianin maupun leukosianin yang terhidrolisis.⁽¹²⁾

Leukosianidin

Menurut Griffith (1958) dalam Williams (1971), analisis dari semua jenis tanaman kakao yang menggunakan cara ekstraksi dengan metanol, menunjukkan adanya 3 leukoantosianidin dalam semua bagian tanaman kakao kecuali lapisan bibit (testa). Menurut Griffith (1960) dalam Williams (1971), leukosianidin keempat terdeteksi dalam keping biji bila bibit diuji.

Flavanol

Menurut Harbone (1967) dalam Williams (1971), total 6 senyawa "katekin-like" telah dilaporkan dalam keping biji kakao, dengan (-)-epikatekin sebagai komponen utama. Katekin diperoleh dalam ekstrak metanol. Flavanol mayor seperti (-)-epikatekin telah ditemukan dalam uji semua bagian tumbuhan *Theobroma cacao*.

Flavonol

Dua flavonol, Kaemferol dan kuersetin dan juga glikosida flavonol (rutin) telah dilaporkan. Flavonol diperoleh dalam hidrolisat asam, sedangkan glikosida

flavonol didapatkan dalam ekstrak metanol. Kuersetin terdistribusi luas dalam tanaman sedangkan kaemferol dan rutin terdistribusi paling terbatas yaitu dalam daun saja. (12)

Pada seri kromatografi kertas eksperimen, Forsyth mengidentifikasi dan mengukur konsentrasi polifenol mayor dalam biji kakao Forastero. Delapan senyawa dengan tiga fraksi mayor yaitu katekin, leukosianidin dan antosianin diidentifikasi. Fraksi keempat yang migrasinya sangat lambat pada kromatografi kertas ditandai sebagai kompleks tanin. (4)

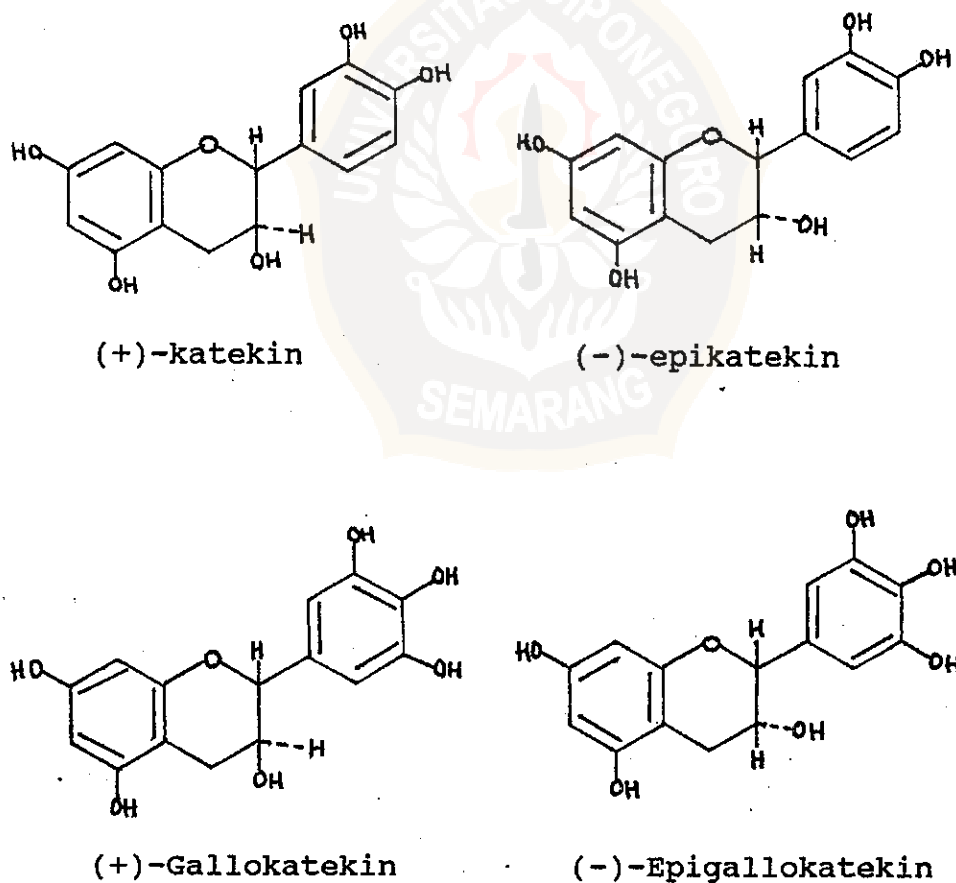
Tabel II.6. Polifenol Biji Kakao Forastero⁽⁴⁾

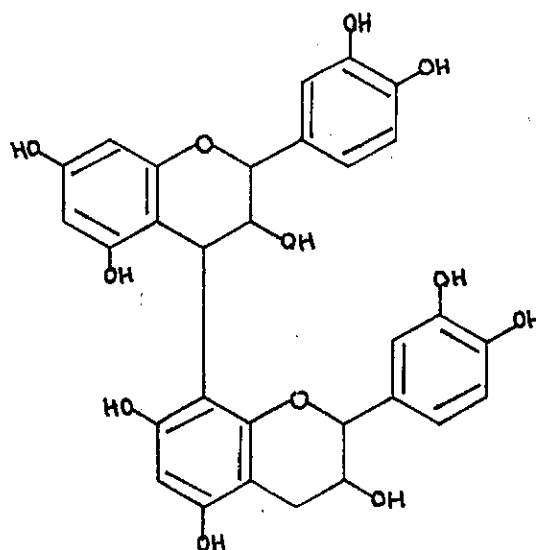
Fraksi		Persen	
		Berat kering	Polifenol total
Katekin	(-) - Epikatekin	2,75	35,00
	(+) - Katekin	0,25	3,00
	(+) - Gallokatekin		
	(-) - Epigallokatekin		
Leukosianidin	Leukosianidin 1	1,60	21,00
	Leukosianidin 2,3	0,80	10,00
Antosianin	3- α -L-Arabinosidyl	\pm 0,30	5,00
	3- β -D-Galaktosidyl Sianidin	\pm 0,10	
Komplek tanin		2,00	26,00
Polifenol total		7,80 (7,10- 9,10)	100,00

Katekin tercatat 33-42% dari seluruh polifenol. 92% adalah (-)-epikatekin. Katekin lain termasuk (+)-katekin, (+)-gallokatekin, dan (-)-epigallokatekin. Lebih dari 50% polifenol adalah leukosianidin dan kompleks tanin, sedang antosianin hanya 5%.⁽⁴⁾

Yang menarik, ada kemiripan antar struktur polifenol biji kakao. Roelofsen mencatat bahwa semua polifenol dalam biji kakao tampak mengacu pada (-)-epikatekin seperti yang terlihat pada gambar II.1.⁽⁴⁾

Gambar II.1. Struktur Kimia Polifenol Penting Kakao⁽⁴⁾

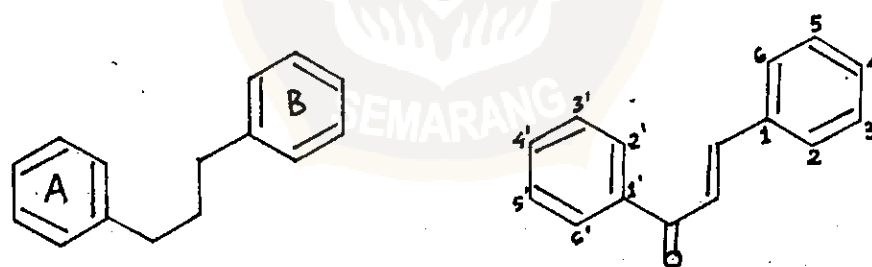




Leukosianidin

Pola oksigenasi cincin A dan B dari struktur diatas dapat diterangkan oleh asal-usul biogenetiknya, dimana cincin A mengikuti pola floroglusinol yang mempunyai pola oksigenasi yang berselang-seling, yakni pada posisi 2', 4' dan 6' dari struktur terbuka kalkon. (14)

Gambar II.2. Struktur kimia flavonoid dan kalkon (14)



Flavonoid

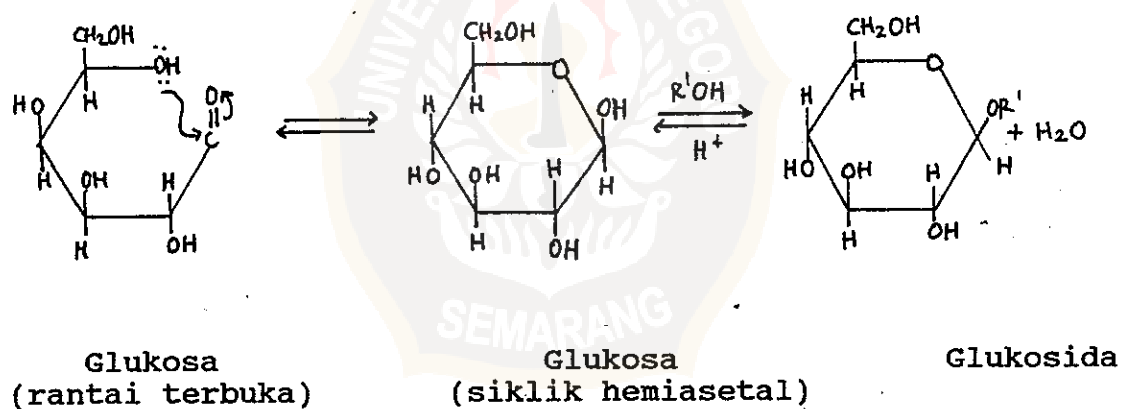
Kalkon

Sedangkan cincin B mengikuti pola katekol atau fenol, yang mempunyai sebuah gugus fungsi oksigen pada posisi para atau dua (masing-masing pada posisi para dan meta) atau tiga

(satu para dan dua meta). Cincin A dari struktur flavonoid berasal dari jalur poliketida, yakni kondensasi dari tiga unit asetat atau malonat, sedangkan cincin B dan 3 atom C dari rantai propan berasal dari jalur fenil propanoid (jalur shikimat). (14)

Sebagian besar dari flavonoid alam ditemukan dalam bentuk glikosida, dengan unit flavonoid terikat pada suatu gula. Suatu glikosida adalah kombinasi antara suatu gula dan suatu alkohol yang saling berikatan melalui ikatan glikosida. (14)

Gambar II.3. Pembentukan Ikatan Glikosida. (14)



Flavonoid dapat ditemukan sebagai mono-, di-, atau triglikosida, dimana satu, dua atau tiga hidroksil dalam molekul flavonoid terikat oleh gula. Suatu glikosida terurai kembali atas komponen-komponennya melalui hidrolisis menghasilkan gula dan alkohol yang sebanding. Alkohol yang dihasilkan disebut aglikon. (14)

2.9. Isolasi dan Pemurnian

Flavonoid yang terdapat dalam tumbuhan umumnya terikat pada gula sebagai glikosida, dan aglikon flavonoid yang manapun mungkin saja terdapat dalam satu tumbuhan dalam beberapa bentuk kombinasi glikosida. Berdasarkan alasan itu, maka dalam menganalisa flavonoid biasanya lebih baik bila kita memeriksa aglikon yang terdapat dalam ekstrak tumbuhan yang telah dihidrolisa sebelum memperhatikan kerumitan glikosida yang mungkin terdapat dalam ekstrak awal.⁽¹⁵⁾

Flavonoid terdapat dalam tumbuhan sebagai campuran; jarang sekali dijumpai hanya flavonoid tunggal yang terdapat dalam jaringan tumbuhan. Campuran yang terdiri atas flavonoid yang berbeda macam dan jumlah gugus fungsinya sering dijumpai.⁽¹⁵⁾ Oleh karena itu, ekstrak awal flavonoid dari tumbuhan dapat diperoleh dengan cara perkolasi. Perkolasi dilakukan dengan menggunakan campuran pelarut polar seperti etanol (EtOH), metanol (MeOH), butanol (BuOH), aseton, dimetilsulfoksida (DMSO), dimetilformamida (DMF) dengan air. Setelah hidrolisis, maka aglikon yang didapat dipisahkan dengan cara kromatografi, kemudian dimurnikan dengan cara rekristalisasi.⁽¹⁶⁾

2.10. Penentuan Struktur Flavonoid

Untuk mengidentifikasi jenis flavonoid dan menentukan pola oksigenasi dapat digunakan metoda spektroskopi serapan ultraviolet-tampak. Sedangkan kedudukan gugus hidroksil

fenol bebas pada inti flavonoid dapat ditentukan dengan menambahkan pereaksi geser ke dalam larutan cuplikan dan mengamati pergeseran puncak serapan yang terjadi. Pereaksi geser yang biasa digunakan yaitu NaOH 2 M, AlCl₃ 5 % dalam metanol, HCl, Natrium Asetat dan Asam Borat. (16)

Gugus fungsi tertentu yang terdapat pada flavonoid dapat diketahui dengan menggunakan metoda spektroskopi inframerah. Metoda spektroskopi massa dapat digunakan untuk menentukan bobot molekul dan menetapkan penyebaran gugus fungsi pada cincin A dan cincin B. Selain menggunakan metoda spektroskopi serapan ultraviolet-tampak, pola oksigenasi dapat ditentukan pula dengan menggunakan metoda spektroskopi NMR. (16)

Jika ternyata hasil yang diperoleh tidak memberikan kristal, maka kita dapat menempuh langkah dengan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi sebagai tindak lanjutnya.