

Literatur Review: Standarisasi Teobromin

Vriezka Mierza¹, Wildani Zakiyah², Galih Ibnu Mukti³, Lestari Mahardika Urbaningrum⁴,
Alya Nafis Hasna'Nisrina⁵

^{1,2,3,4,5} Prodi Farmasi Universitas Singaperbangsa Karawang

Email : vriezka.Mierza.fikes@unsika.ac.id

Abstrak

Teobromin merupakan senyawa alkaloid purin yang banyak ditemukan pada biji kakao. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengumpulkan dan menganalisa artikel isolasi dan karakterisasi teobromin. Penelitian ini menggunakan metode *review article* dengan sumber data penelitian berdasarkan publikasi jurnal yang terdapat diinternet. Berdasarkan hasil *review article* yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa metode ekstraksi teobromin menggunakan maserasi dengan pelarut etanol 70% yang selanjutnya dilakukan proses pemisahan dan purifikasi serta skrining fitokimia dengan uji alkaloid, uji parry, dan uji murexide. Analisis senyawa kimia yang terkandung dalam teobromin menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan memisahkan komponen dalam campuran menggunakan HPLC dengan fase diam C18 non polar dan fase gerak campuran metanol:akuabides (40:60). Hasil rata-rata kadar teobromin pada sampel 1 ($18,0443 \pm 0,8298$) mg, sampel 2 ($21,1753 \pm 0,8716$) mg, dan pada sampel 3 ($32,1292 \pm 1,4765$) mg. Nilai RSD pada masing-masing sampel berturut-turut adalah 4,5988%, 4,1161%, dan 4,5957%, ketiga sampel tersebut memiliki nilai RSD<5% yang menunjukkan bahwa hasil perhitungan dari ketiga sampel tersebut dapat diterima.

Kata Kunci: *Standarisasi, Teobromin, Penentuan*

Abstract

Theobromine is a purine alkaloid compound that is commonly found in cocoa beans. The purpose of this study was to collect and analyze the isolation and characterization of theobromine articles. This study uses the article review method with research data sources based on journal publications on the internet. Based on the results of the review articles carried out, it can be concluded that the theobromine extraction method uses maceration with 70% ethanol solvent which is then carried out by separation and purification processes as well as phytochemical screening with alkaloid tests, parry tests, and murexide tests. Analysis of the chemical compounds contained in theobromine used Thin Layer Chromatography (TLC) and separated the components in the mixture using HPLC with the C18 non-polar stationary phase and the mobile phase a mixture of methanol: aquabides (40:60). The average theobromine level in sample 1 (18.0443 ± 0.8298) mg, sample 2 (21.1753 ± 0.8716) mg, and sample 3 (32.1292 ± 1.4765) mg. The RSD values for each sample were 4.5988%, 4.1161%, and 4.5957% respectively, the three samples had an RSD value of <5% indicating that the calculation results of the three samples were acceptable

Keywords: *Standardization, Theobromine, Determination*

PENDAHULUAN

Theobromine adalah senyawa methylxanthin yang merupakan turunan dari senyawa xanthin dan termasuk dalam kelompok alkaloid purin bersama dengan kafein dan teofilin. Theobromine secara alami ditemukan dalam biji kakao, dan bertanggungjawab terhadap rasa pahit pada coklat (Algharrawi et al., 2017).

Theobromine memiliki aktivitas yang mirip dengan kafein yang dapat bertindak sebagai stimulan. Namun, kafein memiliki beberapa efek samping seperti peningkatan tekanan darah dan insomnia. Di sisi lain, theobromine dilaporkan menyebabkan efek samping yang lebih ringan. Keunggulan tersebut menjadikan theobromine sebagai senyawa yang perlu ditonjolkan pemanfaatannya. Untuk itu diperlukan standarisasi senyawa ini (Adamafio, 2013).

Beberapa metode standarisasi theobromine telah dilakukan oleh banyak peneliti. Metode analisis, identifikasi hingga isolasi dari tumbuhan telah dilaporkan. Analisis kualitatif menggunakan reaksi reagen, kromatografi lapis tipis, *Fourier Transform Infra Red* (FTIR), *Gas Chromatography dan Mass Spectroscopy* (GC-MS) hingga isolasi dengan proses ekstraksi fraksinasi serta mendapatkan senyawa teobromin murni.

METODE

Studi literatur dilakukan dengan menggunakan metode pencarian artikel di Google Scholar, ScienceDirect, dan PubMed, dengan kata kunci 'Standardisasi', 'Theobromine', 'Determinasi' pada artikel nasional maupun internasional antara tahun 2013-2021.

HASIL DAN PEMBAHASAN

SKRINING FITOKIMIA

Dilakukan beberapa uji pada skrining fitokimia menggunakan ekstrak kulit biji kakao untuk mengetahui senyawa metabolit sekundernya yaitu dengan uji alkaloid, uji parry dan uji murexide.

Tabel 1. Uji Fitokimia untuk Identifikasi Teobromin

Uji Fitokimia	Cara	Hasil	Referensi
Uji Alkaloid	Ekstrak ditambahkan larutan asam klorida dan disaring. Lalu, tambahkan 1-2 mL pereaksi Dragendorff	Endapan kuning menyala	(Kayaputri et al., 2014)
Uji parry	Sampel dilarutkan dengan metanol, ditambahkan reagen parry dan ammonia encer	Warna biru tua atau hijau	(Safitri et al., n.d.)
Uji murexide	Sampel ditambahkan 40 mL H ₂ O ₂ 3% dan 1-2 tetes HCl 2%, panaskan di waterbath dan keringkan dengan uap	Warna pink. Ditambahkan 5% ammonia beberapa tetes, warna akan berubah menjadi merah violet	(Safitri et al., n.d.)

Uji alkaloid skrining fitokimia yang dilakukan oleh Kayaputri, et al. (2014) terdapat senyawa alkaloid yakni theobromine dan kafein yang selanjutnya akan dilakukan proses pemisahan. Pada uji parry yang dilakukan oleh Safitri, et al (2022) menunjukkan adanya senyawa alkaloid theobromine dengan jenis alkaloid xantin sedangkan pada uji murexide menghasilkan hasil yang positif bahwa jenis alkaloid tersebut memang benar alkaloid xantin.

Pengujian kualitatif senyawa theobromin dapat digunakan uji parry. Uji parry dilakukan dengan reagen parry dan amonia encer. Jika hasilnya positif akan menunjukkan warna larutan hijau atau biru tua. Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa alkaloid theobromin merupakan salah satu golongan alkaloid xantin . Uji kualitatif murexide digunakan spesifik untuk senyawa alkaloid derivate xantin. Pengujian ini dilakukan dengan menggunakan penambahan 40 ml H₂O₂ 3% dan 1-2 tetes HCl 2% pada sampel, dipanaskan lalu diuapkan sampai kering, sehingga diperoleh warna pink. Diteteskan dengan amonia 5% sampai menjadi merah violet (Safitri et al., n.d.)

ISOLASI TEOBROMIN

PREPARASI SIMPLISIA

Berdasarkan studi literatur yang dilakukan penulis, kebanyakan Theobromine diekstrak dari kakao (*Theobroma cacao* L.), namun didapatkan juga penelitian yang menggunakan polong carob (*Ceratonia siliqua* L.) sebagai sumber senyawa Theobromin. Dua dari tiga penelitian yang meneliti kakao , menggunakan biji kakao sebagai sampel sementara satu lainnya menggunakan kulit kakao. Secara umum, proses persiapan sampel kering hampir sama antara satu penelitian dengan penelitian lain, yaitu dengan mengeringkan kulit buah kakao lalu digiling hingga menjadi serbuk. Proses pengeringan dapat dilakukan dengan diangin-anginkan ataupun dikeringkan di 45°C hingga berat konstan menggunakan lemari pengering inframerah seperti yang dilakukan pada penelitian . Selanjutnya proses penggilingan sampel hingga menjadi serbuk bisa dilakukan dengan alat hammer mill maupun mortar keramik.

PROSES EKSTRAKSI

Metode yang paling umum yang digunakan untuk ekstraksi Theobromine adalah maserasi. Pelarut yang cocok adalah Etanol 70% berdasarkan penelitian yang dilakukan Kayaputri, et al. (2014) yang menyatakan bahwa kandungan alkaloid pada ekstrak kulit biji kakao menggunakan pelarut etanol 70% lebih kuat daripada menggunakan pelarut aseton-air (7:3). Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Nguyen & Nguyen (2017), 70% etanol diperoleh tingkat theobromine terbesar (2,23 mg/100 g berat kering) dibandingkan dengan yang diekstraksi dengan air dan kloroform (0,09 dan 0,35 mg/100 g berat kering). Sementara itu, ada juga penelitian yang menggunakan air sebagai pelarut seperti pada penelitian . dalam penelitiannya juga menggunakan air 80°C sebagai pelarut ekstrak dan menambahkan Carrez I solution di awal untuk memisahkan lemak dengan kandungan lainnya. Setelah campuran mengendap dan mencapai suhu kamar, sediaan ditambahkan NaHCO₃.

Tabel 2. Metode Ekstraksi

Referensi	Sampel	Metode	Pelarut	Waktu dan Suhu
(Kayaputri et al., 2014)	Biji kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	Maserasi	Aseton:air (7:3) dan Etanol 70% dengan rasio antara	24 Jam suhu ruang

			sampel dan pelarut 1:10 (b/v).	
(Nguyen & Nguyen, 2017)	Kulit kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	Maserasi	Air, etanol 70%, dan kloroform dengan rasio antara sampel dan pelarut 1:27 (b/v).	30 menit suhu 100°C, 80°C, dan 60°C
(Peralta-Jiménez & Cañizares-Macías, 2013a)	Biji kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	Maserasi	Air suling dengan rasio antara sampel dan pelarut 1:100 (b/v). Dengan penambahan Carrez I solution dan NaHCO ₃ .	Suhu air suling 80°C, didiamkan hingga mencapai suhu ruangan.
(Khlifa et al., 2013)	Polong carob (<i>Ceratonia siliqua</i> L.)	Maserasi	Air	Sampel ditambahkan dengan air dan dikocok selama 30 menit.

Selain itu, berdasarkan studi literatur (Peralta-Jiménez & Cañizares-Macías, 2013a), juga melakukan penelitian yang membandingkan ekstraksi *stirring method* (SM) dengan metode *ultrasound-assisted extraction method* (UAEM). Alat bantu yang digunakan dalam metode ini adalah probe ultrasound yang dimasukkan ke dalam wadah ekstraksi pada 0,5 cm dari permukaan atas cairan. Selanjutnya, daya 160 W selama 30 detik diterapkan. Hasilnya, ekstraksi dengan UAEM dapat menarik alkaloid (cafein dan theobromine) lebih banyak.

PROSES PEMISAHAN TEOBROMIN DAN KAFEIN

Karena sama-sama berada dalam kelompok alkaloid, juga merupakan dua senyawa metabolit yang paling banyak terdapat di Kulit Buah kakao, pemisahan antara theobromine dan cafein perlu dilakukan. Salah satu penelitian yang menyediakan informasi mengenai pemisahan keduanya adalah penelitian (Peralta-Jiménez & Cañizares-Macías, 2013a) yang menggunakan air sebagai pelarut ekstrak. Pertama-tama, 50 mL ekstrak air encer dipindahkan ke dalam corong pemisah 100 mL, dan sekitar 5,5 mL 1 mol L⁻¹ NaOH ditambahkan untuk mengatur pH antara 12,5 dan 12.7. Kemudian, ekstrak ini diperlakukan dengan empat porsi 5 mL kloroform, dikocok selama 1 menit, dan dibiarkan selama sekitar 5 menit setiap kali. Setelah itu, ekstrak kloroform digabung dalam labu ukur 25 mL dan diencerkan sampai volume dengan kloroform. Selanjutnya, 1 mL larutan ini dipindahkan ke dalam labu ukur 25 mL lainnya dan diencerkan sampai volume dengan kloroform sehingga Caffein akan diukur pada 276 nm. Fase berair selanjutnya dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai volume dengan

air suling dan disaling. Sepuluh mililiter dipindahkan ke dalam labu ukur 100 mL lainnya, dan ditambahkan 50 mL air suling dan 0,55 mL HCl 10%. Kemudian, larutan diencerkan dengan air suling hingga volumenya. Akhirnya, 1 mL dipindahkan ke dalam labu takar 25 mL dan diencerkan sampai volume dengan air suling untuk mengukur Theobromine pada 273.

PEMURNIAN

Pemurnian ekstrak kasar dari kulit buah kakao yang mengandung teobromin adalah untuk menghilangkan zat asing (protein, lipid, pektin, tanin, pigmen, dll.) di dalam ekstrak kasar untuk mendapatkan ekstrak murni atau ekstrak yang diperkaya teobromin. Secara singkat, larutan timbal asetat 10% pada konsentrasi yang berbeda dari 2,5%, 5,0%, 7,5%, 10,0%, dan 12,5% volume ditambahkan ke 40 mL ekstrak kasar. Campuran kemudian dibiarkan pada suhu kamar (32 ± 2 C) selama 15 menit. Setelah perlakuan dengan larutan timbal asetat 10%, sisa timbal asetat dalam ekstrak dihilangkan seluruhnya dengan menggunakan larutan natrium sulfat 10% (berdasarkan pembentukan endapan putih bernama timbal sulfat) kemudian disaring melalui kertas saring Whatman No. 1 untuk mendapatkan ekstrak murni.

KARAKTERISASI TEOBROMIN

Kromatografi lapis tipis (KLT)

KLT adalah suatu metode untuk analisis paling sederhana yang dapat digunakan untuk melakukan penegasan akan senyawa kimia yang terkandung suatu reaksi. Nilai Rf dan warna noda yang tampak pada KLT dapat memberikan identitas senyawa yang terkandung. Nilai Rf biasanya dihitung dengan cara membagi hasil jarak tempuh noda dengan jarak tempuh fase gerak (eluen) (Forestryana & Arnida, 2020)..

Tabel 3. Kromatografi Lapis Tipis untuk Teobromin

Referensi	Fase gerak	Fase diam	Temuan
(Astriany et al., 2016)	Ethanol : Chloroform (3:7)	Silica gel F ₂₅₄	KLT yang digunakan adalah KLT preparatif untuk tahap isolasi. Bercak yang muncul pada plat saat diamati dengan UV 366 nm berada di atas.
(González-Calderón et al., 2015)	Dichloromethane: methanol (95:5)	Silica gel F ₂₅₄	Bercak yang muncul pada lampu UV 254 nm ditandai dengan pensil untuk kemudian dihitung dan dibandingkan nilai Rf sampel dengan standar theobromine
(Ashengroph, 2017)	n-Butanol : acetic acid : water (4:1:1)	Silica gel 60 F ₂₅₄	Hasil KLT diamati dengan UV transiluminator untuk keperluan analisis. Nilai Rf untuk theobromine adalah sekitar 0,48.

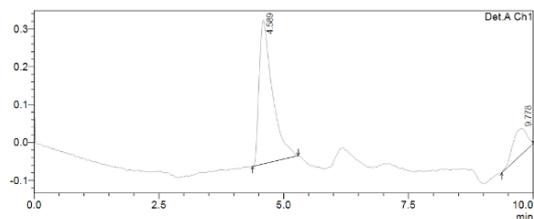
Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

KCKT adalah salah satu teknik kromatografi yang digunakan untuk memisahkan komponen yang ada dalam campuran. KCKT dapat digunakan sebagai uji kualitatif maupun kuantitatif suatu senyawa (Annisia et al., 2019). Pada pengujian theobromin digunakan metode KCKT untuk membandingkan sampel yang diduga mengandung theobromin dengan standar theobromin, istilah ini sering disebut dengan waktu retensi. Kondisi kromatografi yang digunakan ialah menggunakan kolom C18 250 x 4,6 mm, dengan fase gerak metanol dan aquabides 40:60. Panjang gelombang yang

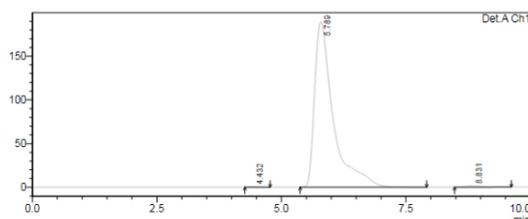
digunakan yaiu 275 dengan running time 10 menit dan flowrate 0,8ml/menit. Standar theobromone 25 mg dilarutkan dengan metanol 25 ml menjadi konsentrasi 1mg/mL. Konsentrasi kemudian dibuat 20, 40, 60, 80, 100, dan 120 µg/mL. Pengujian dilakukan dengan menghitung nilai linearitas, presisi, akurasi, limit of detection dan limit of quantification.

Hasil yang didapatkan yaitu nilai %RSD dari tailing Factor sebesar 1,9562% < 5%, nilai AUC 3,5067% < 5%, nilai lempeng 1776,6350 ≥ 1000 dan nilai resolusi 2,85202 ≥ 2. Nilai linieritas r²=0,9997, Presisi pada konsentrasi baku 20 µg/mL, 60 µg/mL, dan 100 µg/mL diperoleh nilai RSD berurutan yaitu 1,7323%, 1,0175%, dan 1,0866% dimana total presisinya <5% sehingga memenuhi persyaratan. Akurasi menyatakan ukuran kedekatan nilai hasil yang diperoleh dengan nilai yang sesungguhnya. Uji akurasi ini dilakukan dengan penambahan baku sebesar 80%, 100%, dan 120% kedalam sampel dan direplikasi sebanyak 3 kali dengan nilai \bar{x} recovery berturut turut 99,0223; 84,9771; 76,8150. Kriteria % recovery untuk kadar 10 µg/ml adalah 80-110%, 100 µg/ml adalah 90-107%. Recovery % untuk kadar 30 µg/ml adalah 82,2-109,3%. Dimana artinya telah memenuhi persyaratan, sedangkan untuk penambahan baku 120% memiliki nilai akurasi kurang dari 82,2%, yang artinya tidak memenuhi persyaratan. Hasil LOD menunjukkan bahwa konsentrasi terkecil yang masih dapat dideteksi adalah pada konsentrasi 254,9585 µg/ml, sedangkan untuk konsentrasi terkecil yang masih memenuhi kriteria akurasi dan presisi adalah pada konsentrasi 849,8617 µg/ml.

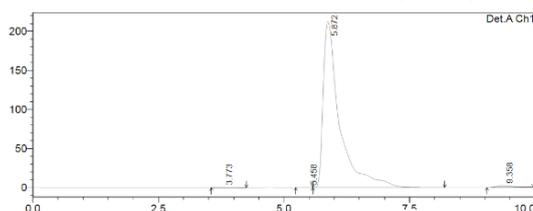
Fase diam yang digunakan pada HPLC adalah C18 non polar dan fase geraknya adalah campuran metanol:akuabides (40:60). Hasil rata-rata kadar teobromin pada sampel 1 sebesar (18,0443 ± 0,8298) mg, sampel 2 sebesar (21,1753 ± 0,8716) mg, dan pada sampel 3 sebesar (32,1292 ± 1,4765) mg. Nilai RSD pada masing-masing sampel berturut-turut adalah 4,5988%, 4,1161%, dan 4,5957%, ketiga sampel tersebut memiliki nilai RSD < 5% yang menunjukkan bahwa hasil perhitungan dari ketiga sampel tersebut dapat diterima.



Gambar 1. Pelarut Kromatogram



Gambar 2. Standar Teobromine Kromatogram



Gambar 3. Sampel bubuk coklat Kromatogram

GAS CHROMATOGRAPHY MASS SPECTROMETRY (GC-MS)

Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS) merupakan teknik kromatografi gas yang digunakan bersama dengan spektrometri massa. Penggunaan Kromatografi gas dilakukan untuk mencari senyawa yang mudah menguap pada kondisi vakum tinggi dan tekanan rendah jika dipanaskan. Sedangkan spektrometri massa untuk menentukan bobot molekul, rumus molekul, dan menghasilkan molekul bermuatan. Kromatografi gas mampu membaca senyawa dengan konsentrasi terendah sehingga metabolit sekunder dalam tanaman dapat teridentifikasi dengan hasil berupa kromatogram dan spektrum massa (Hotmian et al., 2021).

Instrumen yang digunakan adalah GCMS-QP2010 Shimadzu. Kolom yang digunakan adalah DB-5MS (kolom non polar). Panjang = 30 m, diameter = 0,25 mm, suhu injektor 250 oC, suhu detektor 280 oC, suhu program 40oC/2' kenaikan 10 oC per menit hingga 280 oC/3', tekanan 68 Kpa, kecepatan alir 0,9 mL/menit, L. velocity 34,2. Gas pembawa: Helium, Pengionan: EI70Ev, model injeksi: Split. Sampel yang akan diuji disaring terlebih dahulu menggunakan kertas saring Whatman no. 40. Sampel kemudian diencerkan 5 kali untuk dibuat sebanyak 1 mL larutan campuran menggunakan pelarut diklorometana. Sampel diinjeksikan sebanyak 1 µL (Kayaputri et al., 2014).

Senyawa theobromine pada ekstrak kulit biji kakao memiliki persen area tertinggi dibandingkan senyawa yang lain, yaitu 65,99%. Persen area didapatkan berdasarkan luas area puncak yang menyatakan banyaknya jumlah suatu senyawa dalam sampel yang diujikan. Puncak terakhir yang dapat diidentifikasi oleh GC-MS adalah senyawa theobromine. Senyawa ini merupakan salah satu jenis senyawa golongan alkaloid yang menyebabkan rasa pahit pada biji kakao.

Tabel 4. Analisis Data Menggunakan GC-MS

Puncak	Nama Senyawa	RT	SI	MM	Rumus Molekul	Area	Struktur Senyawa
1	2,3-Butandienol	5.277-5.498	97	90	C ₄ H ₁₀ O ₂	6.45	
2	Benzeneacetic acid	13.203	96	136	C ₈ H ₈ O ₂	2.33	
3	Kafein	20.857	96	194	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	23.51	
4	Theobromine	21.621-22.049	93	180	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	65.99	

*RT: Retention Time, SI: Similarity Index, MM: Mass Molecule

Sampel menjadi sasaran analisis kromatografi dalam peralatan GC/MS; merk Shimadzu QP2010, dilengkapi dengan splitter belah/splitless. Dengan kolom kapiler BP5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 mikron) di bawah kondisi kromatografi berikut: Pembawa gas Helium diperoleh dengan fragmen tumbukan elektron dengan kekuatan 70 eV laju 1,2 mL/menit, aliran terbagi 1:50 dan volume sampel yang disuntikkan sebanyak 1 µL. Suhu oven terprogram: suhu awal 70 oC dengan laju pemanasan 10 oC/ menit hingga 300 oC dan tetap stabil pada suhu ini selama 10 menit. Selanjutnya temperatur dinaikkan dengan laju 10C/menit menjadi 300 oC dengan total waktu 78 menit dengan temperatur injektor 250 oC dan temperatur interface 300 oC. Agen sililasi adalah N,O -bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) (González et al., 2019).

Tabel 5. Waktu Retensi dari Kafein dan Teobromin Tiap Sampel

Sample	Caffeine	Theobromine	Manually predominant compound
1	29.490	29.695	Caffeine
2	29.295	29.695	Theobromine
3	29.235	29.865	Theobromine
4	29.230	29.820	Theobromine
5	29.270	29.665	Theobromine
6	29.265	29.695	Theobromine
7	29.250	29.705	Theobromine
8	29.260	29.690	Theobromine
9	20.260	29.880	Theobromine
10	29.255	29.710	Theobromine
11	29.260	29.840	Theobromine
12	28.250	29.890	Theobromine
13	29.250	30.005	Theobromine
14	29.240	29.905	Theobromine
15	29.235	29.800	Theobromine
A	29.260	29.775	Uncertain
B	29.265	29.610	Uncertain
C	29.240	29.750	Theobromine
D	29.245	29.710	Theobromine
E	29.260	29.625	Theobromine
F	29.245	29.915	Theobromine

SIMPULAN

Beberapa metode dapat digunakan untuk standarisasi teobromin. Skrining fitokimia pada senyawa teobromin dilakukan dengan beberapa metode yaitu uji Alkaloid, uji Parry dan uji Meruksida. Isolasi dilakukan dengan cara ekstraksi, fraksinasi, dan isolasi dari senyawa lain seperti kafein. Karakterisasi dapat menggunakan Kromatografi Lapisan Tipis, Kromatografi Cair Tekanan Tinggi, dan Kromatografi Gas dan Spektrofotometri Massa.

DAFTAR PUSTAKA

- Adamafio, N. A. (2013). Theobromine Toxicity and Remediation of Cocoa By-products: An Overview. *Journal of Biological Sciences*, 13(7), 570–576. <https://doi.org/10.3923/jbs.2013.570.576>
- Algharrawi, K. H. R., Summers, R. M., & Subramanian, M. (2017). Production of theobromine by N-demethylation of caffeine using metabolically engineered *E. coli*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 11, 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.06.014>
- Annisa, S., Musfiroh, I., & Indriati, L. (2019). Perbandingan Metode Analisis Instrumen HPLC Dan UHPLC: Article Review. *Farmaka*, 17(3), 189–197.
- Ashengroph, M. (2017). *Salinivibrio costicola* GL6, a Novel Isolated Strain for Biotransformation of Caffeine to Theobromine Under Hypersaline Conditions. *Current Microbiology*, 74(1), 34–41. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1148-z>
- Astriany, D., Bahtiar, Y., & Zainuddin, A. (2016). Sintesis N 1-Isopropilteobromin Menggunakan Teobromin Dan Isopropilbromida dengan Berbagai Konsentrasi Natrium Hidroksida. In *JSTFI Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology: Vol. V* (Issue 2).

- Forestryana, D., & Arnida. (2020). Phytochemical Screenings And Thin Layer Chromatography Analysis Of Ethanol Extract Jeruju Leaf (*Hydrolea Spinosa L.*) Article History. *Farmako Bahari*, 112, 113–124. www.journal.uniga.ac.id
- González, J., Monan, M., Perez, J., Gómez, E., Salgado, D. D. L. C., & Pérez, D. (2019). Determination of Theobromine and Caffeine in Theobroma cacao Husk from Ethanol Extract by GC-MS after CC Separation. *OALib*, 06(11), 1–9. <https://doi.org/10.4236/oalib.1105771>
- González-Calderón, D., González-González, C. A., Fuentes-Benites, A., & González-Romero, C. (2015). Synthesis of caffeine from theobromine: Bringing back an old experiment in a new setting. *Como Se Sintetiza*, 26(1), 9–12.
- Hotmian, E., Suoth, E., Fatimawali, F., & Tallei, T. (2021). Analisis GC-MS (*Gas Chromatography - Mass Spectrometry*) Ekstrak Metanol Dari Umbi Rumput Teki (*Cyperus rotundus L.*). *PHARMACON*, 10(2), 849. <https://doi.org/10.35799/pha.10.2021.34034>
- Kayaputri, I. L., Sumanti, D. M., Djali, M., Indiarto, R., & Dewi, D. L. (2014). Kajian Fitokimia Ekstrak Kulit Biji Kakao (*Theobroma cacao L.*). *Chimica et Natura Acta*, 2(1). <https://doi.org/10.24198/cna.v2.n1.9140>
- Khelifa, M., Bahloul, A., & Kitane, S. (2013). Determination of Chemical Composition of Carob Pod (*Ceratonia Siliqua L*) and its Morphological Study. *J. Mater. Environ. Sci*, 4(3), 348–353.
- Nguyen, V. T., & Nguyen, N. H. (2017). Proximate Composition, Extraction, and Purification of Theobromine from Cacao Pod Husk (*Theobroma Cacao L.*). *Technologies*, 5(2), 14. <https://doi.org/10.3390/technologies5020014>
- Peralta-Jiménez, L., & Cañizares-Macías, M. P. (2013a). Ultrasound-Assisted Method for Extraction of Theobromine and Caffeine from Cacao Seeds and Chocolate Products. *Food and Bioprocess Technology*, 6(12), 3522–3529. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-1014-3>
- Peralta-Jiménez, L., & Cañizares-Macías, M. P. (2013b). Ultrasound-Assisted Method for Extraction of Theobromine and Caffeine from Cacao Seeds and Chocolate Products. *Food and Bioprocess Technology*, 6(12), 3522–3529. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-1014-3>
- Safitri, W., Kusbandari, A., Farmasi Universitas Ahmad Dahlan, F., & author, C. (n.d.). Penetapan Kadar Teobromin pada Bubuk Minuman Cokelat Di Kecamatan Umbulharjo dengan Metode HPLC. In *Journal Farmasi Klinik dan Sains* (Vol. 2022, Issue 1).