



Bioaksesibilitas Senyawa Fenolik Minuman Kakao Pasteurisasi dengan Penambahan Matriks Susu

[Phenolic Bioaccessibility of Pasteurized Cocoa Beverages with Milk Matrix Addition]

Dwi Indah Permata Sari, Endang Prangdimurti*, dan Dias Indrasti

Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB University, Bogor, Indonesia

Received June 9th 2024 / Revised November 21th 2024 / Accepted December 12th 2024

ABSTRACT

Cocoa beans and their derivatives are well-known for their health benefits, primarily attributed to phenolic compounds. While some research has explored the interactions of these compounds within food matrices, there were few reports on the release of cocoa phenolics in the gastrointestinal tract when consumed as part of complex foods. This study aimed to evaluate how incorporation of whole-fat milk powder (CF), skimmed milk powder (CS), and whey protein powder (CW) into pasteurized cocoa beverages impacts the *in vitro* release of phenolic compounds throughout gastrointestinal digestion. The initial analysis included quantifying total phenolics and flavonoids in the undigested samples. Subsequently, simulated gastrointestinal digestion was performed, followed by analysis of total phenolics and flavonoids at each digestion stage. The extent of compound release was expressed as the recovery index (RI) and bioaccessibility index (BI). The results showed that the addition of milk matrices (CF, CS, CW) significantly decreased the total phenolic content of cocoa beverages ($p < 0.05$) across all digestion phases. CW had the highest RI for total phenolics ($202.67 \pm 7.67\%$). This study suggests that although the addition of milk decreased the initial phenolic content in undigested cocoa beverages, an increase in RI of phenolics was observed after the gastric digestion phase, especially in the beverages containing whey protein.

Keywords: bioaccessibility, cocoa beverages, skim milk, whey protein, whole milk

ABSTRAK

Biji kakao dan produk olahannya dikenal luas dengan manfaat kesehatan yang terkandung di dalamnya. Bioaktivitas produk biji kakao sebagian besar diperankan oleh senyawa fenolik. Senyawa fenolik dapat berinteraksi dengan komponen pangan lain selama pengolahan maupun dalam saluran cerna yang dapat memengaruhi bioaktivitasnya. Penelitian terkait interaksi antar komponen pada matriks pangan telah banyak dilakukan, namun belum ditemukan studi yang mengevaluasi pelepasan senyawa fenolik kakao di saluran cerna ketika dikonsumsi sebagai matriks pangan yang kompleks. Tujuan penelitian ini adalah menganalisis pengaruh penambahan matriks susu dalam bentuk susu lemak utuh (CF), susu skim (CS), dan protein whey (CW) terhadap pelepasan fenolik pada minuman kakao pasteurisasi selama pencernaan gastrointestinal secara *in vitro*. Tahapan awal penelitian ini adalah menganalisis total fenolik dan total flavonoid pada sampel non cerna. Tahap selanjutnya sampel melalui fase pencernaan lambung dan usus halus kemudian dianalisis total fenolik dan total flavonoid pada masing-masing fase pencernaan. Kemampuan pelepasan senyawa fenolik dan flavonoid pada masing-masing fase pencernaan dinyatakan sebagai indeks pemulihan (RI) dan indeks bioaksesibilitas (BI). Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan susu (CF, CS, CW) secara signifikan ($p < 0,05$) menurunkan total fenolik minuman kakao pada masing-masing fase pencernaan. Minuman kakao dengan tambahan protein whey (CW) memiliki indeks pemulihan total fenolik tertinggi, yaitu sebesar $202,67 \pm 7,67\%$. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penambahan matriks susu menurunkan total fenolik awal pada sampel sebelum melalui simulasi pencernaan, namun terdapat peningkatan indeks pemulihan total fenolik setelah melalui fase pencernaan lambung, khusus pada sampel yang ditambahkan protein whey susu.

Kata kunci: bioaksesibilitas, minuman kakao, protein whey, susu lemak utuh, susu skim

*Penulis Korespondensi: E-mail: prangdimurti@apps.ipb.ac.id

PENDAHULUAN

Minuman kakao adalah istilah yang merujuk pada sebuah formulasi minuman dengan komponen utamanya berasal dari bubuk biji kakao. Biji kakao dan produk olahannya dikenal secara luas dengan manfaat kesehatan yang terkandung di dalamnya, seperti antioksidan, imunomodulator, antiinflamasi, antihipertensi, dan lain-lain (Cinar *et al.*, 2021; Domínguez-Pérez *et al.*, 2020; He *et al.*, 2016; Martín dan Ramos, 2016; Razola-Díaz *et al.*, 2023). Bubuk kakao asal Indonesia diketahui mengandung 14,80–79,93 mg GAE/g bk senyawa fenolik (Ulvia *et al.*, 2020). Kandungan fenolik pada bubuk kakao ini memiliki korelasi positif dengan kapasitas antioksidannya berdasarkan metode perendaman radikal DPPH dan kemampuan reduksi ion Ferri (*ferric reducing antioxidant power*/FRAP) (Razola-Díaz *et al.*, 2023). Namun, proses pengolahan seperti fermentasi, penyangraian, alkalisasi, hingga penggunaan bahan tambahan seperti susu dan *cocoa butter* akan memengaruhi jumlah, profil, dan komposisi fenolik pada produk olahan yang dihasilkan (Velderrain-Rodríguez *et al.*, 2014).

Penelitian terkait interaksi antar komponen pada matriks pangan telah banyak dilakukan, baik pada produk sebelum dikonsumsi maupun setelah produk memasuki saluran cerna. Khususnya pada bubuk kakao, adanya kandungan lemak dan polifenol dapat menurunkan pencernaan protein produk tersebut (Haliza *et al.*, 2021). Studi proteomik dilakukan oleh Gallo *et al.* (2013) untuk mempelajari interaksi molekuler antara polifenol kakao dan protein susu. Studi tersebut melaporkan bahwa terjadi penurunan aktivitas antioksidan yang disebabkan oleh interaksi fenolik dan protein. Hal sebaliknya dilaporkan oleh Qie *et al.* (2022), penelitiannya pada minuman kopi dengan tambahan susu justru meningkatkan total fenolik terlarut pada fase usus setelah melalui simulasi pencernaan. Peningkatan tersebut diketahui akibat adanya ikatan non-kovalen yang terbentuk antara protein dan fenolik, seperti ikatan elektrostatis, hidrofobik, dan hidrogen yang membuat fenolik lebih stabil selama pencernaan gastrointestinal. Selain protein, komponen lemak juga akan memengaruhi proses penyerapan fitokimia pangan dalam saluran cerna (Alongi *et al.*, 2019; Quan *et al.*, 2020). Seperti yang dijelaskan dalam studi oleh Emami *et al.* (2016), adanya lemak dalam matriks pangan akan membentuk vesikel atau miselisasi liposom yang dapat meningkatkan stabilitas senyawa fenolik di dalam saluran cerna.

Berbagai hasil penelitian menunjukkan efek yang beragam akibat dari adanya interaksi antara polifenol dengan komponen lain, baik dari segi pencernaan protein, penyerapan lemak, aktivitas antioksidan, maupun kemampuan pelepasan fenolik terlarut pada produk setelah dicerna. Namun secara

lebih detail, belum ditemukan studi yang fokus mengevaluasi kemampuan pelepasan senyawa fenolik kakao di saluran cerna ketika dikonsumsi dalam sebuah matriks pangan, khususnya dalam bentuk produk minuman siap konsumsi. Umumnya diperlukan proses pasteurisasi untuk produk minuman kakao siap konsumsi (Baranowska *et al.*, 2020), sehingga perlu diketahui apakah dengan pengolahan yang kompleks ini masih didapatkan manfaat fungsional dari senyawa fenolik yang terkandung dalam produk. Dengan demikian, penelitian ini dilakukan untuk mengonfirmasi dan mengevaluasi pengaruh tambahan matriks susu pada minuman kakao siap konsumsi terhadap pelepasan senyawa fenolik, khususnya di fase pencernaan lambung dan usus halus, sehingga dapat memberikan informasi dalam mengembangkan teknologi pengolahan dan formulasi produk berbasis bubuk kakao dan susu dengan senyawa fungsional yang optimal.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini antara lain bubuk kakao komersial non-alkalisasi (terbuat dari biji kakao campuran Forestero dan Trinitario asal Lampung, Sulawesi Selatan dan NTT, susu bubuk lemak utuh, susu skim, dan protein *whey* bubuk yang masing-masing diperoleh dari *e-commerce*. Bahan untuk simulasi pencernaan antara lain enzim pepsin 25000 U/mL (P7000), enzim pankreatin 100 USP/mg (P7545) dan ekstrak empedu 160 mM (B8631) untuk simulasi pencernaan (Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, Amerika Serikat). Bahan lainnya sebagai komposisi larutan stok *simulated gastric fluid* (SGF) dan *simulated intestinal fluid* (SIF) adalah KCl, KH_2PO_4 , NaHCO_3 , NaCl, $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$, $(\text{NH}_4)\text{CO}_3$, $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$, HCl, dan NaOH. Bahan untuk analisis antara lain akuades, reagen Folin-Ciocalteu (Merck, Jerman), Na_2CO_3 , etanol, AlCl_3 , asam galat dan kuer-setin kualitas *pro-analysis*.

Persiapan sampel minuman kakao

Minuman bubuk kakao dibuat dengan melarutkan 0,5 g campuran antara bubuk kakao dengan susu bubuk lemak utuh (CF), susu skim bubuk (CS), atau protein *whey* bubuk (CW) (1:1 w/w) ke dalam 50 mL akuades. Komposisi campuran minuman kakao ditampilkan pada Tabel 1. Sampel diseduh dengan air mendidih ($\pm 95^\circ\text{C}$) dan dilanjutkan dengan pasteurisasi pada suhu $\pm 65^\circ\text{C}$ selama 30 menit dalam *shaking waterbath* (LSB 045S, Daihan Labtech, Indonesia). Sampel yang telah dipanaskan selanjutnya didinginkan pada suhu ruang. Untuk ekstraksi fenolik sebelum simulasi pencernaan, sampel dibekukan di dalam lemari pembeku untuk selanjutnya dikeringkan

menggunakan *freeze dryer* (ALPHA 1-4 Ldplus, Martin Christ, Jerman).

Tabel 1. Komposisi campuran minuman kakao
Table 1. Mixtures composition of cocoa beverages

Sampel (Sample)	Bubuk Kakao Non- Alkalisasi (Non- Alkalized Cocoa Powder) (g)	Susu Bubuk Lemak Utuh (Whole- Fat Milk Powder) (g)	Susu Skim Bubuk (Skim Milk Powder) (g)	Protein Whey Bubuk (Whey Protein Powder) (g)
C	0.25	-	-	-
CF	0.25	0.25	-	-
CS	0.25	-	0.25	-
CW	0.25	-	-	0.25

Keterangan: C= minuman kakao tanpa susu, CF= minuman kakao dengan penambahan susu bubuk lemak utuh, CS= minuman kakao dengan penambahan susu skim bubuk, CW= minuman kakao dengan penambahan protein whey bubuk

Note: C= cocoa beverages without milk, CF= cocoa beverages with full cream milk powder, CS= cocoa beverages with skim milk powder, CW= cocoa beverages with whey protein powder

Simulasi pencernaan

Simulasi pencernaan dilakukan mengacu pada metode rekomendasi dari Minekus *et al.* (2014). Simulasi pencernaan fase lambung dilakukan dengan menginkubasi sampel bersama campuran cairan *simulated gastric fluid* (SGF) dan enzim pepsin. Proses yang terjadi di dalam saluran cerna disimulasikan secara *in vitro* di dalam *shaking waterbath* (LSB 045S, Daihan Labtech, Indonesia) dengan menambahkan berbagai campuran cairan lambung dan usus halus. Komposisi cairan SGF merujuk pada Minekus *et al.* (2014) yang ditampilkan pada Tabel 2. Simulasi fase lambung dilakukan dengan mencampurkan larutan sampel dengan larutan stok SGF (5:4) hingga mencapai volume akhir larutan 50:50 (v/v) setelah ditambahkan air dan enzim di dalam Erlenmeyer. Pepsin (EC 3.4.23.1) ditambahkan hingga mencapai 2000 U/mL pada campuran akhir, kemudian ditambahkan larutan CaCl_2 hingga mencapai konsentrasi 0,075 mM pada campuran akhir. Penambahan HCl (1 N) dilakukan untuk mengatur kondisi campuran menjadi pH 3. Sejumlah air ditambahkan pada campuran akhir untuk melarutkan SGF bersama sampel. Sampel diinkubasi bersama semua komponen campuran SGF di dalam *shaking waterbath* dengan kecepatan 80 rpm pada suhu 37 °C selama 2 jam. Setelah inkubasi, sampel dimasukkan ke *ice bath* untuk memastikan inaktivasi enzim pada fase lambung. Pengambilan 10 mL sampel hasil simulasi fase lambung dilakukan dan disentrifugasi (3500 rpm, 1 jam, 25 °C) untuk memisahkan supernatan (fraksi terlarut) dan residu (fraksi tak larut).

Sampel hasil pencernaan lambung selanjutnya ditambahkan larutan *simulated intestinal fluid* (SIF) merujuk pada Minekus *et al.* (2014) yang ditampilkan pada Tabel 2 (5:4), enzim pankreatin 100 U/mL, garam empedu 10 mM, dan CaCl_2 0,3 M. Rasio volume sampel hasil pencernaan lambung dengan volume komponen pencernaan usus halus adalah sebesar 50:50 (v/v). Kemudian sampel diinkubasi bersama semua komponen campuran SIF di dalam *shaking waterbath* dengan kecepatan 80 rpm pada suhu 37 °C selama 2 jam. Selanjutnya sampel dimasukkan ke *ice bath* atau wadah berisi air es untuk menginaktivasi enzim. Sampel yang telah melalui simulasi pencernaan lambung dan usus halus kemudian disentrifugasi (3500 rpm, 1 jam, 25 °C) untuk memisahkan supernatan (fraksi terlarut) dan residu (fraksi tak larut). Supernatan disimpan dalam botol kaca gelap bertutup di lemari pendingin hingga analisis.

Ekstraksi minuman kakao

Sampel kering minuman kakao, sampel hasil cerna fase lambung dan hasil cerna hingga fase usus diekstraksi dengan metode yang merujuk Laila *et al.* (2020). Sampel ditambahkan dengan pelarut etanol 50% (v/v) dengan rasio 1:20 (w/v) untuk sampel kering dan 1:5 (v/v) untuk sampel cair hasil simulasi pencernaan. Campuran kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer* (Wina Instruments 206, Indonesia) selama 30 menit pada suhu 50 °C. Setelah itu sampel disentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 3000 rpm dan suhu 25 °C. Supernatan diambil dari hasil sentrifugasi kemudian disimpan di lemari pendingin (± 4 °C) semalaman. Selanjutnya ekstrak etanol tersebut disentrifugasi kembali selama 15 menit pada kecepatan 3000 rpm dan suhu 25 °C. Supernatan diambil dan disaring menggunakan kertas saring Whatman No. 41. Filtrat hasil penyaringan disimpan dalam botol kaca gelap bertutup di lemari pendingin, selanjutnya disebut sebagai ekstrak minuman kakao. Ekstrak ini digunakan untuk analisis karakteristik total fenolik dan flavonoid.

Kadar total fenolik

Kadar total fenolik pada sampel sebelum dan setelah simulasi pencernaan dianalisis dengan metode yang mengacu pada Laila *et al.* (2020). Reagen Folin-Ciocalteu 10% sebanyak 1,5 mL ditambahkan pada 1,5 mL ekstrak minuman kakao. Setelah itu, 1,5 mL akuades dan 2,5 mL larutan Na_2CO_3 20% ditambahkan lalu diinkubasi selama 30 menit dalam kondisi gelap. Absorbansi sampel diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis (UV Mini-1240 Shimadzu, Jepang) pada panjang gelombang 750 nm. Akuades digunakan sebagai blanko alat pada pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Total fenolik dinyatakan sebagai mg asam galat ekuivalen per g sampel (mg GAE/g) berdasarkan kurva standar asam galat.

Tabel 2. Formulasi larutan stok *simulated gastric fluid* (SGF) dan *simulated intestinal fluid* (SIF) untuk volume akhir 500 mLTable 2. Formulation of *simulated gastric fluid* (SGF) and *simulated intestinal fluid* (SIF) stock solutions for a final volume of 500 mL

Larutan Garam (Salt Solutions)	Konsentrasi Stok (Stock Concentration) (mol/L)	SGF		SIF	
		pH 3		pH 7	
		Volume Stok (Stock Volume) (mL)	Konsentrasi Akhir dalam SGF (Final Volume in SGF) (mmol/L)	Volume Stok (Stock Volume) (mL)	Konsentrasi Akhir dalam SIF (Final Volume in SIF) (mmol/L)
KCl	0.5	6.9	6.9	6.8	6.8
KH ₂ PO ₄	0.5	0.9	0.9	0.8	0.8
NaHCO ₃	1	12.5	25	42.5	85.0
NaCl	2	11.8	47.2	9.6	38.4
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0.15	0.4	0.1	1.1	0.33
(NH ₄) ₂ CO ₃	0.5	0.5	0.5	-	-
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	0.3	-	0.15	-	0.6

Sumber (Source): Minekus *et al.* (2014)**Kadar total flavonoid**

Metode analisis total flavonoid mengacu pada Halim *et al.* (2013). Ekstrak minuman kakao sebanyak 5 mL dicampur dengan 5 mL larutan AlCl₃ 2%. Campuran dihomogenkan lalu didiamkan selama 10 menit dalam kondisi gelap. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 415 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Akuades digunakan sebagai blanko alat pada pengukuran absorbansi. Total flavonoid dinyatakan dalam mg kuersetin ekuivalen per g sampel (mg QE/g) berdasarkan kurva standar kuersetin.

Indeks pemulihan dan indeks bioaksesibilitas

Recovery index (RI) atau indeks pemulihan menunjukkan persentase fenolik atau flavonoid yang terdapat pada fraksi terlarut di fase lambung, sedangkan *bioaccessibility index* (BI) atau indeks bioaksesibilitas adalah persentase fenolik atau flavonoid pada fraksi terlarut yang telah melewati fase lambung dan usus halus. Hasil perhitungan indeks ini menunjukkan proporsi senyawa fenolik atau flavonoid yang tersedia untuk dapat diserap di saluran cerna (Ortega *et al.*, 2011). Indeks pemulihan (RI) dan indeks bioaksesibilitas (BI) dihitung berdasarkan persamaan (1) dan (2).

$$RI (\%) = A/C \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

$$BI (\%) = B/C \times 100 \dots\dots\dots (2)$$

Keterangan: A= nilai total fenolik/total flavonoid sampel setelah simulasi pencernaan fase lambung, B= nilai total fenolik/total flavonoid sampel setelah simulasi pencernaan fase usus, C= nilai total fenolik/total flavonoid sampel sebelum melalui simulasi pencernaan.

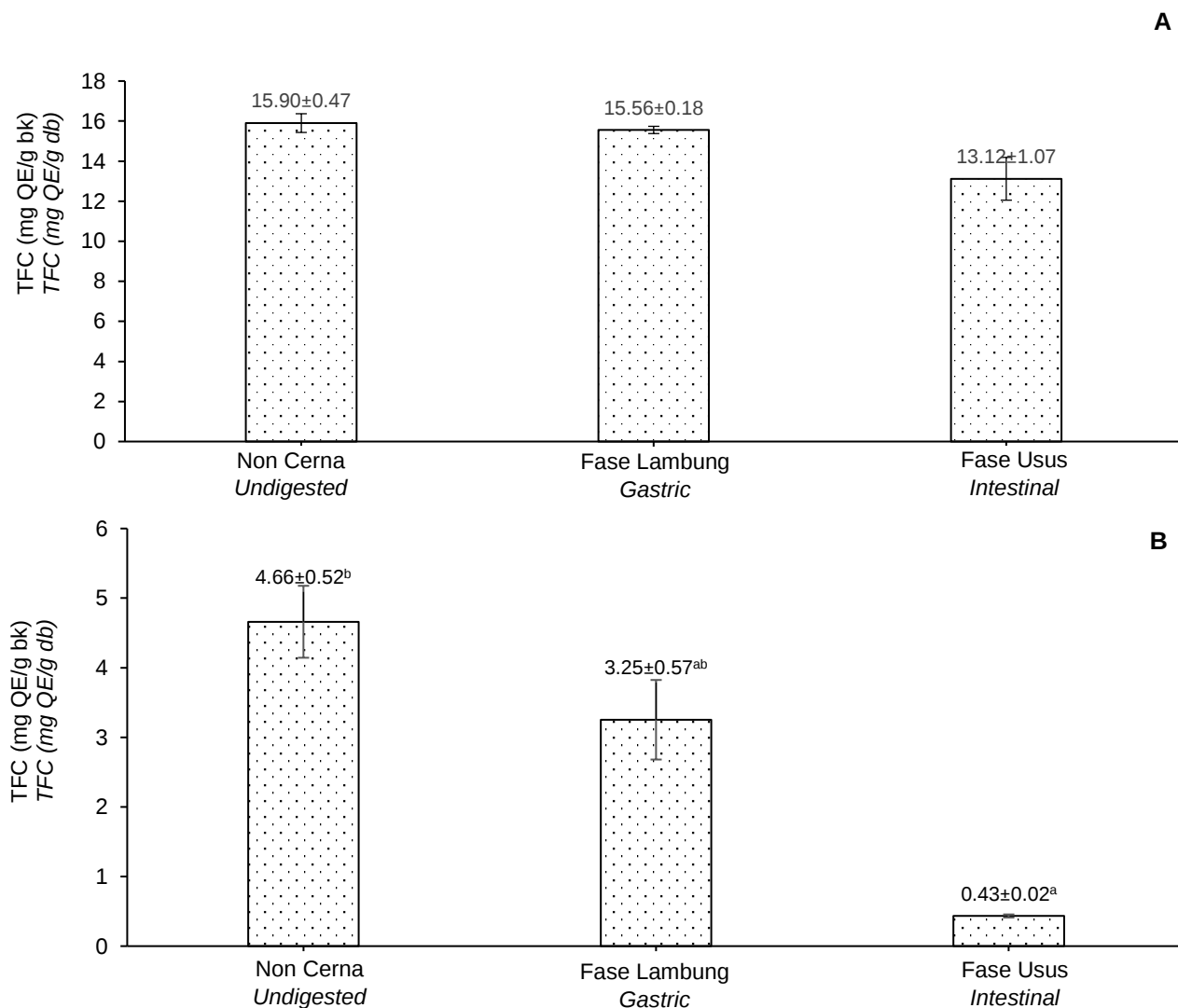
Analisis statistik

Pengolahan data hasil analisis total fenolik, total flavonoid, indeks pemulihan serta indeks bioaksesibilitas menggunakan Rancangan Acak Lengkap

(RAL) dengan dua kali ulangan dan setiap ulangan di-analisis secara duplo. Komposisi zat gizi merujuk pada *certificate of analysis* (CoA) produsen dan tidak diolah secara statistik. Metode yang digunakan dalam analisis data secara statistik adalah analisis keragaman (ANOVA) dan uji lanjut *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN**Total fenolik dan total flavonoid minuman kakao tanpa penambahan susu**

Pengukuran kadar total senyawa fenolik dan flavonoid dilakukan pada sampel minuman kakao sebelum dan setelah melalui simulasi pencernaan. Hasil pengukuran yang ditampilkan pada Gambar 1 menunjukkan bahwa terjadi penurunan kadar total fenolik maupun total flavonoid pada sampel setelah melalui simulasi pencernaan, khususnya pada fase usus. Penurunan total fenolik tidak berbeda signifikan, namun total flavonoid pada fase usus menurun secara signifikan ($p < 0,05$). Flavonoid sendiri merupakan salah satu kelompok senyawa fenolik terbesar khususnya yang teridentifikasi pada biji kakao segar (Oracz *et al.*, 2015). Total flavonoid pada sampel minuman kakao tanpa susu terukur jauh lebih sedikit jika dibandingkan dengan total fenolik pada sampel yang sama. Hasil ini menunjukkan bahwa sebagian besar senyawa fenolik pada sampel bukan termasuk golongan flavonoid. Terlepas dari jenis bahan pangan yang dianalisis, Gao *et al.* (2022) menyatakan bahwa secara umum, terjadi penurunan total flavonoid pada bahan pangan yang diproses dengan pemanasan konvensional seperti sangrai dan pasteurisasi. Penurunan senyawa flavonoid pada bubuk kakao yang digunakan pada penelitian ini diduga akibat dari berbagai paparan panas seperti pada tahap pengeringan, penyangraian, penggilingan, penyeduhan hingga pasteurisasi sampel.



Keterangan: Total fenolik terlarut/TPC (A), total flavonoid terlarut/TFC (B), nilai dinyatakan dalam rerata±standar error (n=2), angka-angka yang diikuti huruf yang berbeda pada analisis yang sama menunjukkan perbedaan signifikan berdasarkan uji lanjut Duncan ($p<0,05$)

Note: Total phenolic content (TPC) (A), total flavonoid content (TFC) (B), values expressed as mean±standard error (n=2), values with different superscript letters in column showed significant differences based on Duncan's Multiple Range Test ($p<0.05$)

Gambar 1. Total fenolik (A) dan total flavonoid (B) minuman kakao tanpa susu di tiap fase pencernaan
Figure 1. Total phenolic (A) and flavonoid content (B) of cocoa beverages without milk in each digestion phase

Penurunan kadar total fenolik dan flavonoid pada minuman kakao setelah fase usus dapat berkaitan dengan pengaruh pH yang berubah-ubah selama simulasi pencernaan. Penelitian Qie *et al.* (2021) menunjukkan bahwa pH pencernaan pada fase usus secara signifikan meningkatkan kehilangan senyawa katekin pada teh, kehilangan ini terukur lebih banyak dibandingkan pada kondisi pH lambung. Perubahan pH selama pencernaan akan memengaruhi stabilitas senyawa fenolik, salah satunya dengan mengubah struktur kimianya. Senyawa fenolik dilaporkan dapat dengan mudah teroksidasi dalam kondisi pH alkali, kondisi ini mengubah fenolik men-

jadi kuinon yang dapat dengan mudah berikatan secara kovalen dengan protein nukleofil (Tosif *et al.*, 2021). Reaksi ini akan membentuk kompleks yang *irreversible* dan menurunkan kadar total fenolik.

Selain akibat perubahan pH, interaksi fenolik dengan enzim pencernaan juga dapat membentuk kompleks protein-fenolik yang dapat mengurangi jumlah fenolik bebas atau fenolik terlarut yang terukur. Qie *et al.* (2021) menyatakan bahwa afinitas senyawa katekin dengan enzim tripsin lebih besar dibandingkan pada katekin dengan enzim pepsin. Adanya ikatan yang semakin kuat pada senyawa kompleks fenolik-tripsin membuatnya kehilangan

aktivitas sebagai senyawa fenolik. Interaksi ini juga dapat terjadi antara fenolik-pankreatin saat minuman kakao memasuki fase pencernaan usus halus sehingga menurunkan total fenolik terlarut pada sampel.

Indeks pemulihan dan bioaksesibilitas fenolik minuman kakao tanpa susu

Definisi bioaksesibilitas merujuk pada fraksi senyawa yang mampu dilepaskan dari matriks pangan di dalam saluran pencernaan sehingga tersedia untuk diserap di usus halus (Odriozola-Serrano *et al.*, 2023). Bioavailabilitas diartikan sebagai laju penyerapan suatu senyawa untuk dapat terbawa hingga ke sirkulasi darah. Dengan demikian, semakin tinggi bioaksesibilitas suatu senyawa, maka akan semakin tinggi juga bioavailabilitasnya (Odriozola-Serrano *et al.*, 2023). Penyerapan senyawa fenolik sebagian besar terjadi di usus halus, walau beberapa dapat diserap di lambung (Kamiloglu *et al.*, 2015; Konishi *et al.*, 2006; Rahman *et al.*, 2022). Jumlah senyawa fenolik yang dapat diakses di fase lambung dinyatakan dalam indeks pemulihan, sedangkan jumlah fenolik yang tersedia untuk dapat diserap di fase usus

dinyatakan dalam nilai indeks bioaksesibilitas (Martínez-Las Heras *et al.*, 2017).

Turunnya total fenolik dan flavonoid di fase usus membuat nilai indeks bioaksesibilitas lebih rendah dibandingkan indeks pemulihannya (Tabel 3 dan Tabel 4). Hal ini berkaitan dengan ketidakstabilan senyawa fenolik di kondisi alkali pada pH usus dan interaksinya dengan senyawa lain termasuk enzim pencernaan (Deng *et al.*, 2018; Cabrera-Ramírez *et al.*, 2020). Akibat tingginya penurunan total flavonoid di fase usus, indeks bioaksesibilitas flavonoid terhitung jauh lebih rendah dibandingkan indeks bioaksesibilitas total fenolik (Tabel 4). Hal ini menunjukkan bahwa fenolik yang berhasil dilepaskan dalam fraksi terlarut pada fase usus bukan termasuk kelompok flavonoid. Banyak hal yang dapat memengaruhi bioaksesibilitas senyawa fenolik. Terjadi berbagai perubahan kimia selama sampel melalui fase pencernaan, seperti hidrolisis, reduksi, oksidasi, dan isomerisasi (Sahu *et al.*, 2023). Perubahan kimia tersebut juga dipengaruhi oleh kondisi di dalam saluran cerna, kompleksitas suatu matriks pangan, enzim pencernaan serta struktur dan karakteristik senyawa fenolik itu sendiri (Quan *et al.*, 2020).

Tabel 3. Indeks pemulihan total fenolik dan total flavonoid minuman kakao

Table 3. Recovery index of total phenolic content in cocoa beverages

Sampel (Sample)	Indeks Pemulihan (Recovery Index) (%)	
	Total Fenolik (Total Phenolic Content)	Total Flavonoid (Total Flavonoid Content)
Bubuk kakao (Cocoa powder)	97.95±1.74 ^a	74.34±20.51
Bubuk kakao + susu bubuk lemak utuh (Cocoa powder + whole-fat milk powder)	128.83±25.65 ^{ab}	33.35±12.69
Bubuk kakao + susu skim bubuk (Cocoa powder + skim milk powder)	109.86±5.62 ^a	30.01±2.21
Bubuk kakao + protein whey bubuk (Cocoa powder + whey protein powder)	202.67±7.67 ^b	54.72±10.43
<i>p</i>	0.054	0.410

Keterangan: Nilai disajikan sebagai rata-rata±standar error (n= 2). Angka-angka yang diikuti huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan signifikan berdasarkan uji lanjut Duncan ($p<0,05$)

Note: Values are expressed as mean±standard error (n= 2). Values with different superscript letters in column showed significant differences based on Duncan's Multiple Range Test ($p<0.05$)

Tabel 4. Indeks bioaksesibilitas total fenolik dan total flavonoid minuman kakao

Table 4. Bioaccessibility index of total flavonoid content in cocoa beverages

Sampel (Sample)	Indeks Bioaksesibilitas (Bioaccessibility Index) (%)	
	Total Fenolik (Total Phenolic Content)	Total Flavonoid (Total Flavonoid Content)
Bubuk kakao (cocoa powder)	82.26±4.30	9.42±0.57 ^b
Bubuk kakao + susu bubuk lemak utuh (Cocoa powder + whole-fat milk powder)	79.91±10.69	4.54±0.86 ^a
Bubuk kakao + susu skim bubuk (Cocoa powder + skim milk powder)	93.07±5.17	4.56±0.45 ^a
Bubuk kakao + protein whey bubuk (Cocoa powder + whey protein powder)	98.05±18.52	7.54±0.73 ^{ab}
<i>p</i>	0.826	0.052

Keterangan: Nilai disajikan sebagai rata-rata±standar error (n= 2). Angka-angka yang diikuti huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan signifikan berdasarkan uji lanjut Duncan ($p<0,05$)

Note: Values are expressed as mean±standard error (n= 2). Values with different superscript letters in column showed significant differences based on Duncan's Multiple Range Test ($p<0.05$)

Total fenolik dan total flavonoid minuman kakao dengan tambahan susu

Penambahan ketiga jenis susu yang berbeda pada penelitian ini dimaksudkan untuk mewakili sebagian kecil dari berbagai jenis formulasi produk minuman kakao yang ada di pasaran. Tabel 5 menunjukkan kandungan nutrisi pada jenis susu yang ditambahkan, mengacu pada sertifikat hasil analisis yang dikeluarkan oleh produsen produk komersial yang dipakai. Matriks susu yang ditambahkan memiliki kandungan protein, lemak, dan laktosa yang berbeda-beda. Hal ini dapat memengaruhi pelepasan senyawa fenolik selama pencernaan. Penambahan susu bubuk dilakukan pada campuran kering bersama bubuk kakao sebelum kemudian diseduh dan dipasteurisasi. Pasteurisasi pada penelitian ini dimaksudkan untuk menyerupai kondisi yang mungkin dilakukan pada industri minuman kakao siap konsumsi.

Tabel 5. Komposisi zat gizi masing-masing matriks susu

Table 5. Nutrient composition of each milk matrix

Komponen (bk) (Nutrients (db))	Susu Bubuk Lemak Utuh (Whole-Fat Milk Powder) (%)	Susu Skim Bubuk (Skim Milk Powder) (%)	Protein Whey Bubuk (Whey Protein Powder) (%)
Protein (Protein)	24.23	32.94	12.50
Lemak (Fat)	26.18	0.72	0.70
Laktosa (Lactose)	40.30	54.50	76.10
Mineral (Mineral)	5.80	7.90	7.70

Keterangan: bk= basis kering

Note: db= dry basis

Hasil pada Gambar 2 menunjukkan total fenolik minuman kakao dengan tambahan susu lemak utuh (CF), susu skim (CS), maupun whey (CW) pada sampel produk asli (tanpa melalui simulasi pencernaan) tidak menunjukkan perbedaan nilai yang signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan matriks susu yang ditambahkan tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap total fenolik pada sampel produk asli (tanpa melalui simulasi pencernaan). Gambar 2 juga menunjukkan terjadinya peningkatan kadar total fenolik pada tiap sampel di fase lambung, namun terjadi penurunan total fenolik di fase usus. Peningkatan fenolik pada minuman kakao dengan tambahan whey (CW) di fase lambung terukur secara signifikan ($p < 0,05$). Jika dilihat dari Tabel 5, kandungan protein terendah ke tertinggi berturut-turut yaitu pada protein whey bubuk, susu bubuk lemak utuh, lalu susu skim bubuk. Pola ini berhubungan dengan peningkatan total fenolik di fase lambung dari tertinggi ke terendah, yaitu sampel dengan tambahan protein whey (CW), susu skim

(CS), lalu susu lemak utuh (CF). Secara tidak langsung hasil ini juga menunjukkan bahwa perbedaan jenis protein yang terkandung pada matriks susu memengaruhi interaksinya dengan senyawa fenolik dalam saluran cerna. Hamzalioglu *et al.* (2023) dan Tosif *et al.* (2021) menyatakan bahwa fenolik memiliki afinitas yang lebih besar dengan protein amorf (kasein) dibandingkan dengan protein globular (whey). Kasein cenderung akan mengendap di kondisi lambung, termasuk fenolik yang sebelumnya berikatan dengan protein ini (Ng-Kwai-Hang, 2011). Hal ini dapat menjadi salah satu penyebab minuman kakao dengan tambahan susu skim dan lemak utuh yang masih mengandung kasein memiliki total fenolik di fase lambung lebih rendah dibandingkan minuman kakao dengan tambahan protein whey.

Walau minuman kakao dengan tambahan whey (CW) memiliki total fenolik di fase lambung tertinggi, namun fenolik bebas yang bertahan di fase usus halusnya justru paling rendah. Hamzalioglu *et al.* (2023) dalam studinya melaporkan bahwa interaksi protein-fenolik terjadi lebih intens di fase usus halus, didorong oleh kondisi pH yang sesuai di fase tersebut. Namun, hasil penelitian tersebut menunjukkan hasil yang berlawanan, bahwa interaksi protein-fenolik mampu melindungi fenolik dari degradasi yang terjadi pada fase usus halus. Hal ini mengonfirmasi bahwa perilaku interaksi antara fenolik dengan makromolekul lain dalam suatu matriks pangan yang kompleks tidak dapat diprediksi (Günel-Köroğlu *et al.*, 2023). Khususnya pada minuman kakao, hasil penelitian ini secara tidak langsung menunjukkan bahwa senyawa fenolik pada bubuk kakao mampu membentuk ikatan dengan protein, lemak ataupun laktosa yang terkandung pada masing-masing matriks susu, sehingga total fenolik yang terukur lebih rendah dibandingkan minuman kakao tanpa matriks susu.

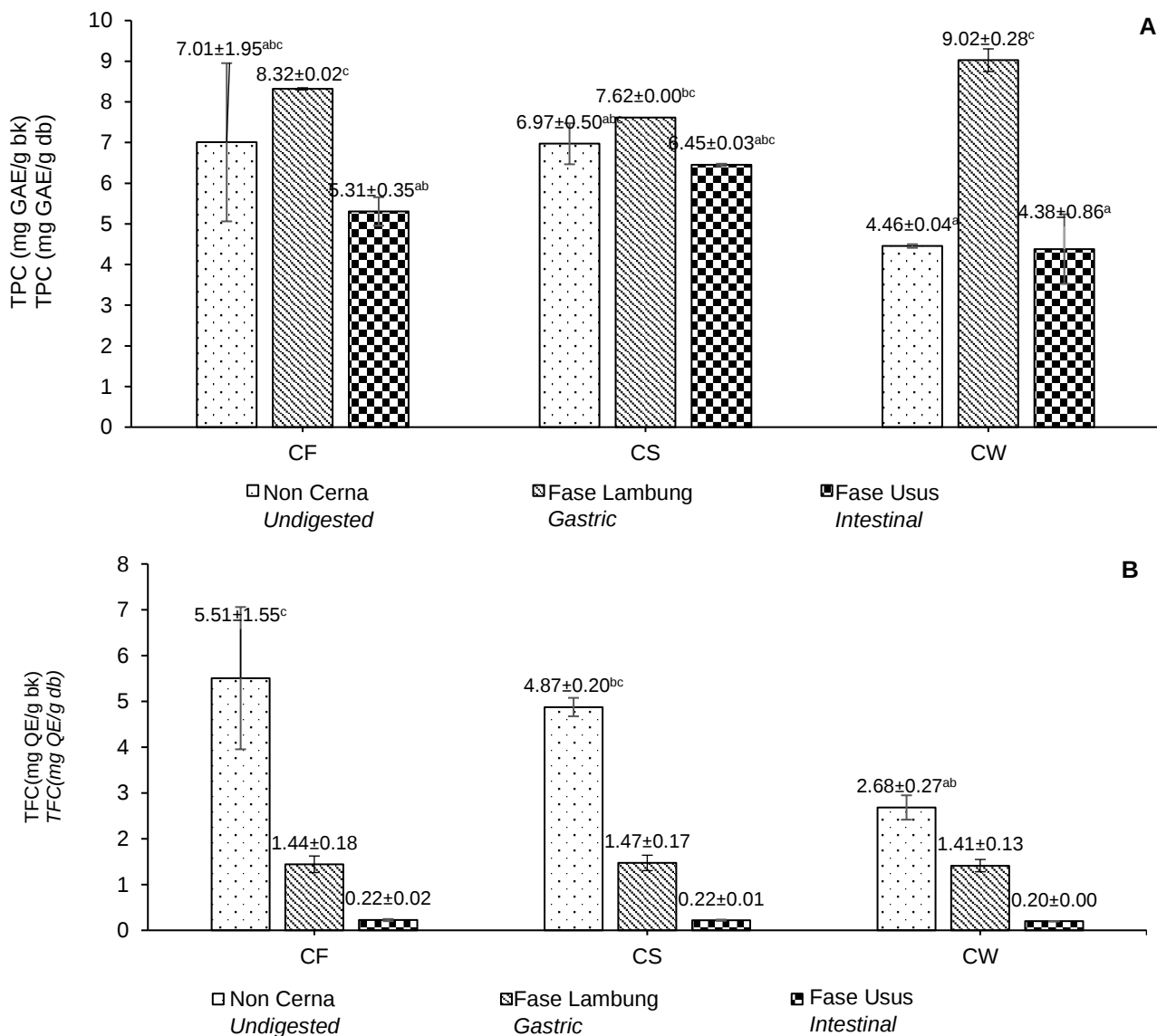
Indeks pemulihan dan bioaksesibilitas fenolik minuman kakao dengan tambahan susu

Penambahan tiga jenis matriks susu menghasilkan indeks pemulihan dan bioaksesibilitas fenolik yang lebih tinggi dibandingkan dengan sampel tanpa tambahan susu, kecuali pada indeks pemulihan pada sampel CF (Tabel 3 dan Tabel 4). Indeks pemulihan menunjukkan nilai yang lebih tinggi dibandingkan indeks bioaksesibilitas pada semua sampel. Hal ini berarti lebih banyak fenolik dibebaskan di fase lambung dibandingkan pada fase usus. Beberapa studi melaporkan bahwa senyawa fenolik tertentu dapat diserap di lambung melalui *monocarboxylic acid transporter* (MCT) serupa dengan transporter yang bekerja pada penyerapan fenolik di usus halus (Konishi *et al.*, 2006; Kamiloglu *et al.*, 2015; Rahman *et al.*, 2022). Selain itu, kehadiran senyawa fenolik di lambung dapat bermanfaat sebagai penghambat peroksidasi lipid, membantu penyembuhan tukak lambung serta mampu melindungi mukosa lambung

dari lesi yang disebabkan oleh ulkus di lambung (Sumbul *et al.*, 2011; Jakobek *et al.*, 2023).

Penambahan protein *whey* menunjukkan indeks pemulihan fenolik tertinggi dan berbeda signifikan ($p < 0,05$) di antara sampel yang lain, sedangkan indeks bioaksesibilitas fenoliknya tidak berbeda signi-

fikan. Indeks pemulihan yang tinggi menunjukkan bahwa fenolik pada sampel dengan tambahan *whey* lebih banyak dibebaskan pada fase lambung. Pelepasan fenolik yang lebih tinggi ini diduga akibat interaksi fenolik-*whey* yang lebih mudah dibebaskan di fase lambung.



Keterangan: Total fenolik terlarut/TPC (A); Total flavonoid terlarut/TFC (B); Minuman kakao dengan penambahan susu bubuk lemak utuh (CF); susu skim bubuk (CS); dan protein *whey* bubuk (CW); nilai dinyatakan dalam rata-rata ± standar error ($n = 2$), angka-angka yang diikuti huruf yang berbeda pada analisis yang sama menunjukkan perbedaan signifikan berdasarkan uji lanjut Duncan ($p < 0,05$)

Note: Total phenolic content/TPC (A); Total flavonoid content/TFC (B); Cocoa beverages with full cream milk powder (CF); skim milk powder (CS); and whey protein powder (CW); values expressed as mean ± standard error ($n = 2$), values with different superscript letters in column showed significant differences based on Duncan's Multiple Range Test ($p < 0.05$)

Gambar 2. Total fenolik (A) dan total flavonoid (B) minuman kakao dengan tambahan susu di tiap fase pencernaan

Figure 2. Total phenolic (A) and flavonoid (B) content of cocoa beverages with milk in each digestion phase

Ng-Kwai-Hang (2011) menjelaskan bahwa kasein akan menggumpal dan membentuk gel di lambung akibat pH asam, sehingga pelepasan fenolik dari senyawa kompleks yang terbentuk akibat interaksi-nya dengan kasein (terkandung pada susu *full cream* dan skim) membutuhkan waktu 2x lebih lama dibandingkan jika fenolik berinteraksi dengan *whey*, sehingga menyebabkan lebih banyak fenolik dibebaskan pada sampel dengan tambahan *whey*. Sedangkan ketika sudah mencapai pada fase usus, sampel dengan tambahan susu *full cream* dan skim yang mengandung kasein sudah dapat lebih mudah dicerna. Hal ini dijelaskan oleh Ng-Kwai-Hang (2011) bahwa kelompok protein kasein memiliki struktur kurang rapat akibat proporsi prolin yang tinggi sehingga dapat lebih mudah dihidrolisis oleh enzim fase usus. Hal ini diduga sebagai penyebab proporsi fenolik pada fase usus tidak berbeda signifikan pada semua sampel.

Berbeda dengan total fenolik, indeks pemulihan dan bioaksesibilitas total flavonoid minuman kakao dengan tambahan susu terhitung lebih rendah dibandingkan dengan minuman kakao tanpa tambahan susu, walau tidak berbeda signifikan pada beberapa sampel (Tabel 3 dan Tabel 4). Hal ini juga ditunjukkan pada Gambar 2, terlihat bahwa total flavonoid secara umum menurun signifikan ($p < 0,05$) setelah melalui fase lambung dan usus. Penurunan total flavonoid sampel pada penambahan semua jenis matriks susu di fase lambung dan usus menunjukkan pola yang cukup seragam. Studi oleh Balakrishnan dan Schneider (2020) menjelaskan bahwa kehilangan flavonoid selama fase pencernaan diakibatkan oleh rendahnya kestabilan flavonoid pada kondisi pH pencernaan, khususnya pH alkali di fase usus. Selain itu, interaksinya dengan makromolekul dalam matriks pangan dapat menyebabkan kerusakan flavonoid atau pelepasan flavonoid dengan makromolekul tersebut yang tidak optimal.

Perbedaan paling tinggi pada susu bubuk lemak utuh dibandingkan dua jenis matriks susu lainnya adalah pada kandungan lemaknya (Tabel 5). Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa kandungan lemak yang tinggi dapat meningkatkan ketersediaan fenolik dalam saluran cerna, khususnya pada fase usus (Emami *et al.*, 2016). Teori ini berlawanan dengan hasil pada Tabel 4 yang menunjukkan indeks bioaksesibilitas minuman kakao dengan tambahan susu lemak utuh (CF) justru yang paling rendah. Namun, hal ini dapat dijelaskan karena meningkatnya penyerapan fenolik berkaitan dengan sekresi garam empedu yang juga meningkat selama pencernaan makanan tinggi lemak. Garam empedu yang semakin tinggi akan meningkatkan jumlah terbentuknya struktur misel yang sekaligus meningkatkan stabilitas fenolik (Gonzales *et al.*, 2015). Peningkatan sekresi garam empedu selama pencernaan tidak dapat terjadi pada simulasi pencernaan secara statis seperti

yang dilakukan pada penelitian ini, sehingga lemak yang tinggi pada matriks dengan tambahan susu lemak utuh tidak dapat meningkatkan bioaksesibilitas fenolik. Penelitian selanjutnya direkomendasikan untuk melihat pengaruh ini dengan mensimulasikan proses pencernaan secara dinamis seperti *simulator of the human intestinal microbial ecosystem* (SHIME) dan *simulator gastro-intestinal* (SIMGI) (Go'sciniak *et al.*, 2022).

Penelitian ini secara keseluruhan merekomendasikan penambahan protein *whey* susu pada produk berbasis kakao khususnya dalam bentuk minuman pasteurisasi, dengan tujuan untuk mendapatkan ketahanan fenolik yang optimal di saluran cerna. Selain jenis matriks susu yang ditambahkan, jenis bubuk kakao non alkalisasi lebih direkomendasikan untuk mendapatkan kandungan fenolik yang lebih tinggi. Bubuk kakao jenis ini masih belum banyak diminati di pasaran karena bubuk kakao yang telah dialkalisasi (*dutched cocoa*) memiliki cita rasa dan kelarutan yang lebih baik. Walau demikian, penelitian terdahulu telah melaporkan bahwa proses alkalisasi dapat menurunkan senyawa fenolik pada bubuk kakao (Urbańska *et al.*, 2019).

KESIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa penambahan susu menurunkan total fenolik awal pada minuman kakao sebelum melalui saluran cerna, namun jumlahnya meningkat pada fase lambung dan kembali turun pada fase usus. Secara umum, indeks pemulihan dan bioaksesibilitas fenolik meningkat pada minuman kakao dengan tambahan susu. Penambahan protein *whey* pada minuman kakao menghasilkan indeks pemulihan fenolik tertinggi dibandingkan dengan tambahan matriks susu lain. Hal ini menunjukkan bahwa ketahanan dan pelepasan senyawa fenolik di saluran cerna dipengaruhi oleh kompleksitas matriks pangan, dalam hal ini adalah jenis matriks susu yang memiliki komposisi protein dan lemak yang berbeda.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) No. LOG-10635/LPDP.3/2024 di bawah Kementerian Keuangan Republik Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

Alongi, M., Calligaris, S., & Anese, M. (2019). Fat concentration and high-pressure homogenization affect chlorogenic acid bioaccessibility and α -glucosidase inhibitory capacity of milk-

- based coffee beverages. *Journal of Functional Foods*, 58, 130–137.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.04.057>
- Balakrishnan, G., & Schneider, R. G. (2020). Quinoa flavonoids and their bioaccessibility during in vitro gastrointestinal digestion. *Journal of Cereal Science*, 95, 103070.
<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2020.103070>
- Baranowska, M., Suliborska, K., Todorovic, V., Kuszniereicz, B., Chrzanowski, W., Sobajic, S., & Bartoszek, A. (2020). Interactions between bioactive components determine antioxidant, cytotoxic and nutrigenomic activity of cocoa powder extract. *Free Radical Biology and Medicine*, 154, 48–61.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.04.022>
- Cabrera-Ramírez, A. H., Luzardo-Ocampo, I., Ramírez-Jiménez, A. K., Morales-Sánchez, E., Campos-Vega, R., & Gaytán-Martínez, M. (2020). Effect of the nixtamalization process on the protein bioaccessibility of white and red sorghum flours during in vitro gastrointestinal digestion. *Food Research International*, 134, 109234.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109234>
- Cinar, Z. Ö., Atanassova, M., Tumer, T. B., Caruso, G., Antika, G., Sharma, S., Sharifi-Rad, J., & Pezzani, R. (2021). Cocoa and cocoa bean shells role in human health: An updated review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 103, 104115.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104115>
- Deng, J., Yang, H., Capanoglu, E., Cao, H., & Xiao, J. (2018). Technological aspects and stability of polyphenols. In *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*. Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813572-3.00009-9>
- Domínguez-Pérez, L. A., Beltrán-Barrientos, L. M., González-Córdova, A. F., Hernández-Mendoza, A., & Vallejo-Cordoba, B. (2020). Artisanal cocoa bean fermentation: From cocoa bean proteins to bioactive peptides with potential health benefits. *Journal of Functional Foods*, 73, 104134.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104134>
- Emami, S., Azadmard-Damirchi, S., Peighambaroust, S. H., Valizadeh, H., & Hesari, J. (2016). Liposomes as carrier vehicles for functional compounds in food sector. *Journal of Experimental Nanoscience*, 11(9), 737–759.
<https://doi.org/10.1080/17458080.2016.1148273>
- Gallo, M., Vinci, G., Graziani, G., De Simone, C., & Ferranti, P. (2013). The interaction of cocoa polyphenols with milk proteins studied by proteomic techniques. *Food Research International*, 54(1), 406–415.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.07.011>
- Gao, Y., Xia, W., Shao, P., Wu, W., Chen, H., Fang, X., Mu, H., Xiao, J., & Gao, H. (2022). Impact of thermal processing on dietary flavonoids. *Current Opinion in Food Science*, 48, 100915.
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100915>
- Gołsciniak, A., Eder, P., Walkowiak, J., & Cielecka-Piontek, J. (2022). Artificial gastrointestinal models for nutraceuticals research — achievements and challenges: A Practical Review. *Nutrients*, 14(13), 2560.
<https://doi.org/10.3390/nu14132560>
- Gonzales, G. B., Smagghe, G., Grootaert, C., Zotti, M., Raes, K., & Camp, J. Van. (2015). Flavonoid interactions during digestion, absorption, distribution and metabolism: A sequential structure-activity/property relationship-based approach in the study of bioavailability and bioactivity. *Drug Metabolism Reviews*, 47(2), 175–190.
<https://doi.org/10.3109/03602532.2014.1003649>
- Günel-Köroğlu, D., Lorenzo, J. M., & Capanoglu, E. (2023). Plant-based protein-phenolic interactions: effect on different matrices and in vitro gastrointestinal digestion. *Food Research International*, 173, 113269.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113269>
- Halim, J. M., R. Pokatong, W. D., & Ignacia, J. (2013). Antioxidative characteristics of beverages made from a mixture of lemongrass extract and green tea. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, 24(2), 215–221.
<https://doi.org/10.6066/jtip.2013.24.2.215>
- Haliza, W., Purwani, E. Y., Fardiaz, D., & Suhartono, M. T. (2021). In vitro protein digestibility of enzymatically pre-treated cocoa bean powder using commercial protease. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 828(1).
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/828/1/012024>
- Hamzalioglu, A., Tagliamonte, S., Gökmen, V., & Vitaglione, P. (2023). Casein-phenol interactions occur during digestion and affect bioactive peptide and phenol bioaccessibility. *Food and Function*, 14(20), 9457–9469.
<https://doi.org/10.1039/d3fo02630b>
- He, Z., Tao, Y., Zeng, M., Zhang, S., Tao, G., Qin, F., & Chen, J. (2016). High pressure homogenization processing, thermal treatment and milk matrix affect in vitro bioaccessibility of phenolics in apple, grape and orange juice to different extents. *Food Chemistry*, 200, 107–

116.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.045>
- Jakobek, L., Ištuk, J., Barron, A. R., & Mati, P. (2023). Bioactive phenolic compounds from apples during simulated *in vitro* gastrointestinal digestion: kinetics of their release. *Applied Sciences*, 13(14), 8434.
<https://doi.org/10.3390/app13148434>
- Kamiloglu, S., Capanoglu, E., Grootaert, C., & van Camp, J. (2015). Anthocyanin absorption and metabolism by human intestinal Caco-2 cells—A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 21555–21574.
<https://doi.org/10.3390/ijms160921555>
- Konishi, Y., Zhao, Z., & Shimizu, M. (2006). Phenolic acids are absorbed from the rat stomach with different absorption rates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7539–7543.
<https://doi.org/10.1021/jf061554>
- Laila, U., Nurhayati, R., Khasanah, Y., Herawati, E. R. N., & Wiyono, T. (2020). Preliminary study of cocoa powder's polyphenol extraction by food grade solvent. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 462(1).
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/462/1/012037>
- Martín, M. A., & Ramos, S. (2016). Cocoa polyphenols in oxidative stress: Potential health implications. *Journal of Functional Foods*, 27, 570–588.
<https://doi.org/10.1016/J.JFF.2016.10.008>
- Martínez-Las Heras, R., Pinazo, A., Heredia, A., & Andrés, A. (2017). Evaluation studies of persimmon plant (*Diospyros kaki*) for physiological benefits and bioaccessibility of antioxidants by *in vitro* simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 214, 478–485.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.104>
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Maclerzanka, A., MacKie, A., ... Brodtkorb, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food—an international consensus. *Food and Function*, 5(6), 1113–1124.
<https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>
- Ng-Kwai-Hang, K. F. (2011). Milk proteins: heterogeneity, fractionation, and isolation. In *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Second Ed., pp. 751–764). Elsevier Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00429-5>
- Odriozola-Serrano, I., Nogueira, D. P., Esparza, I., Vaz, A. A., Jiménez-Moreno, N., Martín-Belloso, O., & Ancín-Azpilicueta, C. (2023). Stability and bioaccessibility of phenolic compounds in rosehip extracts during *in vitro* digestion. *Antioxidants*, 12(5), 1–17.
<https://doi.org/10.3390/antiox12051035>
- Oracz, J., Nebesny, E., & Żyżelewicz, D. (2015). Changes in the flavan-3-ols, anthocyanins, and flavanols composition of cocoa beans of different *Theobroma cacao* L. groups affected by roasting conditions. *European Food Research and Technology*, 241(5), 663–681.
<https://doi.org/10.1007/s00217-015-2494-y>
- Ortega, N., Macia, A., Romero, M., Reguant, J., Motilva, M. (2011). Matrix composition effect on the digestibility of carob flour phenols by an *in-vitro* digestion model. *Food Chemistry*, 124, 65–71.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.101>
- Qie, X., Cheng, Y., Chen, Y., Zeng, M., Wang, Z., Qin, F., Chen, J., Li, W., & He, Z. (2022). *In vitro* phenolic bioaccessibility of coffee beverages with milk and soy subjected to thermal treatment and protein–phenolic interactions. *Food Chemistry*, 375, 131644.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131644>
- Qie, X., Wu, Y., Chen, Y., Liu, C., Zeng, M., Qin, F., Wang, Z., Chen, J., & He, Z. (2021). Competitive interactions among tea catechins, proteins, and digestive enzymes modulate *in vitro* protein digestibility, catechin bioaccessibility, and antioxidant activity of milk tea beverage model systems. *Food Research International*, 140, 110050.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110050>
- Quan, W., Qie, X., Chen, Y., Zeng, M., Qin, F., Chen, J., & He, Z. (2020). Effect of milk addition and processing on the antioxidant capacity and phenolic bioaccessibility of coffee by using an *in vitro* gastrointestinal digestion model. *Food Chemistry*, 308, 125598.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125598>
- Rahman, M., Rahaman, S., Islam, R., Rahman, F., Mithi, F. M., Alqahtani, T., Almikhlaifi, M. A., Alghamdi, S. Q., Alruwaili, A. S., Hossain, S., Ahmed, M., Das, R., Emran, T. Bin, & Uddin, S. (2022). Role of phenolic compounds in human disease: current. *Molecules*, 27(233), 1–36.
<https://doi.org/10.3390/molecules27010233>
- Razola-Díaz, M. del C., Aznar-Ramos, M. J., Verardo, V., Melgar-Locatelli, S., Castilla-Ortega, E., & Rodríguez-Pérez, C. (2023). Exploring the nutritional composition and bioactive compounds in different cocoa powders. *Antioxidants*, 12(3), 1–16.
<https://doi.org/10.3390/antiox12030716>

- Sahu, R., Mandal, S., Das, P., Ashraf, G. J., Dua, T. K., Paul, P., Nandi, G., & Khanra, R. (2023). The bioavailability, health advantages, extraction method, and distribution of free and bound phenolics of rice, wheat, and maize: A Review. *Food Chemistry Advances*, 3, 100484. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100484>
- Sumbul, S., Ahmad, M. A., Asif, M., & Akhtar, M. (2011). Role of phenolic compounds in peptic ulcer: An overview. *Journal of Pharmacy & BioAllied Sciences*, 3(3), 361–368. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.84437>
- Tosif, M. M., Najda, A., Bains, A., Krishna, T. C., Chawla, P., Dyduch-Siemińska, M., Klepacka, J., & Kaushik, R. (2021). A comprehensive review on the interaction of milk protein concentrates with plant-based polyphenolics. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13548. <https://doi.org/10.3390/ijms222413548>
- Ulvia, B., Andarwulan, N., & Hunaefi, D. (2020). Profile of bioactive compounds and antioxidant capacity of Indonesian cocoa powder: a case of food processing authentication. *Proceedings of the 2nd SEAFAST International Seminar (2nd SIS 2019) - Facing Future Challenges: Sustainable Food Safety, Quality and Nutrition*, 97–105. <https://doi.org/10.5220/0009977300970105>
- Urbańska, B., Derewiaka, D., Lenart, A., & Kowalska, J. (2019). Changes in the composition and content of polyphenols in chocolate resulting from pre-treatment method of cocoa beans and technological process. *European Food Research and Technology*, 245(10), 2101–2112. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03333-w>
- Velderrain-Rodríguez, G. R., Palafox-Carlos, H., Wall-Medrano, A., Ayala-Zavala, J. F., Chen, C. Y. O., Robles-Sánchez, M., Astiazaran-García, H., Alvarez-Parrilla, E., & González-Aguilar, G. A. (2014). Phenolic compounds: Their Journey after Intake. *Food and Function*, 5(2), 189–197. <https://doi.org/10.1039/C3FO60361J>