

DEGRADASI BIKSIN SELAMA PEMANASAN DAN PENCAHAYAAN

Degradation of Bixin During Heating and Illumination

Ardiyanto Pranata¹, Sri Raharjo², Umar Santoso², Haryadi².

ABSTRACT

The kinetics of thermal and light induced degradation of natural bixin in a mixture of ethanol and 2 % acetic acid (80 : 20) was studied as a function of temperatures 80, 98, and 125 °C for 120 minutes. Illumination was carried out either under fluorescent or incandescent lights, both at 4000 lux for 300 minutes. The bixin concentration during heating and illumination was analysed using HPLC. The method to determine the degradation rate constant for the decay of the products from bixin was obtained using a linear regression according to first order reaction. The results indicated that the degradation rates of bixin at 125 °C were 5.5 and 3.8 times faster than that of 80 °C and 98 °C, respectively. The energy activation of bixin was 9.82 kcal/mol. The photodegradation rate constants of bixin under incandescent or fluorescent illumination was 2.8×10^{-3} and 3.3×10^{-3} minutes⁻¹, respectively.

Key words: bixin colorant, thermal, incandescent light, fluorescent light, kinetics

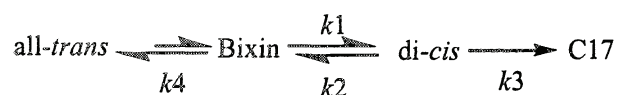
PENDAHULUAN

Warna berperan penting pada penampilan produk pangan. Spektra warna merupakan fenomena yang kompleks. Pewarna bixin digunakan secara luas dalam industri makanan untuk memberi warna merah. Bixin merupakan karotenoid yang penting dari beberapa karotenoid *cis*-alami, yang diperkirakan pembentukannya melalui pemecahan oksidatif enzimatis dari struktur asiklik C₄₀H₅₆ dari likopen (Britton, 1998; Mercadante dkk., 1997). Bixin merupakan kelompok senyawa karotenoid yang tidak jenuh, sehingga mudah terdegradasi oleh oksigen, panas maupun cahaya (Bonnie dan Choo, 1999; Najar, 1988; Scotter dkk., 2001). Kemampuan bixin sebagai antifotooksidan, baik sebagai penstabil oksigen singlet maupun sebagai penangkap radikal bebas, berhubungan erat dengan struktur ikatan rangkap terkonjugasi yang dimiliki senyawa karotenoid ini (Di Mascio dkk., 1989; Haila, 1999).

Pencahayaan dan pemanasan makanan yang mengandung bixin menyebabkan terjadinya pemucatan warna karena bixin terdegradasi, sehingga kerusakan struktur bixin akibat fotodegradasi maupun pemanasan mempengaruhi fungsi bixin sebagai antifotooksidan. Cahaya *incandescent* maupun *fluorescent* merupakan salah satu

penyebab terjadinya degradasi bixin. Cahaya *incandescent* berasal dari radiasi panas, sedangkan cahaya *fluorescent* berasal dari energi kimia (Anonim, 2006(a); Satter dan deMan, 1975).

Hasil degradasi termal annatto yang merupakan sumber utama bixin dikarakterisasi sebagai isomer yang berwarna kuning yang merupakan produk hidrolisis *trans*-monometil ester dari 4,8-dimetil tetradeka, heksaenadionat (C17), m-silen, dan toluena (McKeown, 1963; McKeown, 1965; Scotter, 1995). Rios, dkk. (2005) menggambarkan reaksi degradasi bixin sebagai berikut:



Penurunan konsentrasi bixin akibat degradasi panas atau cahaya ditunjukkan dengan nilai C. Laju degradasi pembentukan C dari konsentrasi bixin awal (C₀) ditunjukkan oleh persamaan (Taoukis dkk., 1997) :

$$(1) \quad -\frac{dC}{dt} = kC^m$$

¹Program Studi Ilmu Pangan, Jurusan Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta 55281.

²Jurusan Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta 55281.

Integrasi Persamaan 1 menghasilkan persamaan :

(2)

$$\ln \frac{C_0}{C} = kt$$

Dari persamaan 2 dapat ditentukan konstanta laju degradasi biksin oleh cahaya dan panas. Konstanta laju degradasi panas yang berhubungan dengan suhu dapat didekati dengan persamaan Arrhenius (3) (Taoukis dkk., 1997) :

(3)

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT}$$

Dari Persamaan 3 dapat dihitung energi aktivasinya.

Dalam hal ini;

A = Tetapan Arrhenius

C₀ = Konsentrasi awal

C = Konsentrasi setelah waktu t

E_a = Energi aktivasi

k = Konstanta laju reaksi (menit⁻¹)

m = Ordo reaksi

R = Tetapan gas universal (1.9872 kal/mol)

T = Suhu absolut (Kelvin)

t = Waktu (menit)

Tujuan perhitungan energi aktivasi untuk mengetahui besarnya energi kinetika yang berubah menjadi energi potensial, pada saat terjadi tumbukan molekul yang mengawali reaksi pada suhu 80, 98, dan 125 °C.

Karotenoid sebagai antioksidan mampu menstabilkan oksigen singlet dan menangkap radikal bebas peroksil (Palozza dan Krinsky, 1992). Struktur karotenoid yang memiliki jumlah ikatan rangkap terkonjugasi serta gugus ujungnya (siklik atau asiklik) maupun substituen pada cincinnya merupakan faktor penting untuk penstabilan oksigen singlet (Stahl dan Sies, 1996). Oleh karena itu kerusakan struktur biksin yang disebabkan oleh degradasi panas dan cahaya diduga berpengaruh kuat terhadap peran biksin sebagai antifotooksidan. Tujuan penelitian ini adalah menentukan kinetika degradasi biksin selama pemanasan maupun pencahayaan.

BAHAN DAN METODE

Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah metil linoleat dari Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA), biksin murni dari ChromaDex (USA), all-trans-biksin (Central Science Laboratory, UK). Kalium iodida, asam asetat, kloroform, etanol, natrium tiosulfat, eritrosin dan amilum diperoleh dari Merck (Darmstadt, Germany).

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah dua kotak generator oksigen singlet berukuran 70 x 50 x 60 cm yang

masing-masing dilengkapi dengan 4 buah lampu *incandescent* 60 Watt (Philips) dan 4 buah lampu *fluorescent* 15 watt (Silvania), yang dilengkapi motor *Synchronous* 5 rpm. Alat lain yang digunakan untuk analisis antara lain : propipet, timbangan analitik, penangas air, termometer, oven (Heraeus UT-5042 EK), pengukur intensitas cahaya (Extect, Cole-Palmer Instrument, Co.), HPLC (Shimadzu).

Pemanasan Biksin

Biksin dilarutkan dalam campuran etanol dan 2% asam asetat aqueous (80 : 20), kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi tertutup (tinggi 15 cm x diameter 1,5 cm) dan dipanaskan dalam oven (Heraeus UT-5042 EK) pada suhu 80, 98 dan 125 °C selama 120 menit (metode Rios, dkk., 2005). Selanjutnya sampel segera didinginkan dengan air mengalir. Biksin dianalisis menggunakan HPLC dengan kolom Shim-pack CLC-ODS 2 C-18 pengamatan pada panjang gelombang 450 nm. Eluen yang digunakan adalah campuran asetonitril dan 2% asam asetat aqueous (65 : 35) kecepatan 2 mL per menit dan sampel diinjeksikan sebanyak 20 µL pada suhu 30 °C. Larutan standar digunakan sebagai pembanding (metode Scotter, dkk., 1998).

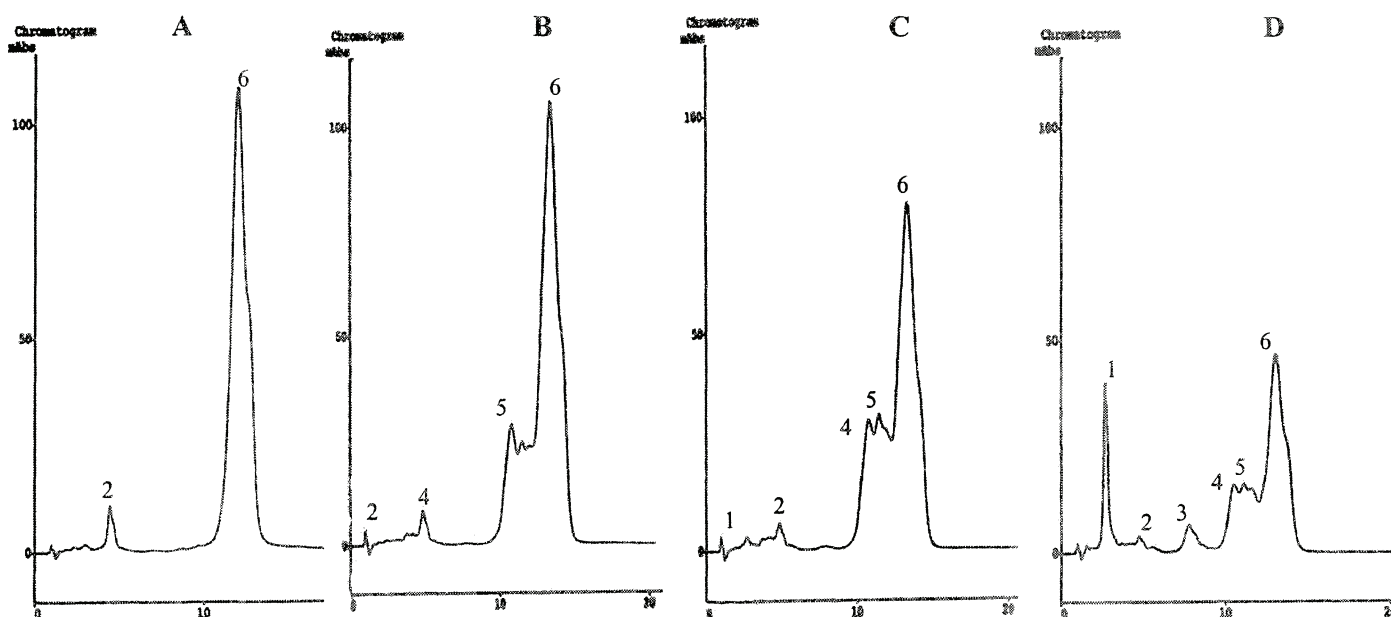
Pencahayaan Biksin

Larutan biksin 1,0 x 10⁻⁵ M dalam campuran etanol dan 2% asam asetat aqueous (80 : 20) dimasukkan ke dalam botol berkapasitas 25 mL yang ditutup dengan penyumbat karet dan dibungkus aluminium foil, selanjutnya dikenai cahaya *fluorescent* atau *incandescent* (4000 lux) selama 60, 120, 180, 240 dan 300 menit. Biksin dianalisis menggunakan HPLC kolom Shim-pack CLC-ODS 2 C-18 pengamatan pada panjang gelombang 450 nm. Eluen yang digunakan adalah campuran asetonitril dan 2% asam asetat aqueous (65 : 35) pada kecepatan 2 mL per menit dan sampel diinjeksikan sebanyak 20 µL pada suhu 30 °C. Larutan standar digunakan sebagai pembanding (metode Scotter, dkk., 1998).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Degradasi Biksin Selama Pemanasan

Gambar 1 memperlihatkan perubahan biksin (3,95 ppm) akibat degradasi oleh pemanasan pada suhu 80, 98 dan 125 °C selama 120 menit yang dianalisis menggunakan HPLC pada panjang gelombang 450 nm, sedangkan prosentase biksin yang terdegradasi dan senyawa lain yang terbentuk pada pemanasan tersebut dapat dilihat pada Tabel 1. Pemilihan suhu pemanasan didasarkan atas penelitian sebelumnya oleh Bittencourt, dkk. (2005) yang menunjukkan biksin mulai mengalami degradasi pada suhu 80 °C.



Gambar 1. Kromatogram (A) standar bixsin dan bixsin sesudah pemanasan pada (B) 80 °C; (C) 98 °C; dan (D) 125 °C selama 2 jam, eluen asetonitril: 2% asam asetat aqueous (65 : 35), dideteksi pada panjang gelombang 450 nm menggunakan HPLC kolom Shim-pack CLC-ODS 2 C-18 (1: C17, 2 dan 3: tidak diketahui; 4: all-trans-bixsin; 5: di-cis-bixsin; 6 cis-bixsin)

Tabel 1. Persentase Bixsin yang Terdegradasi dan All-Trans-Bixsin yang terbentuk pada Pemanasan Bixsin (Metode HPLC)

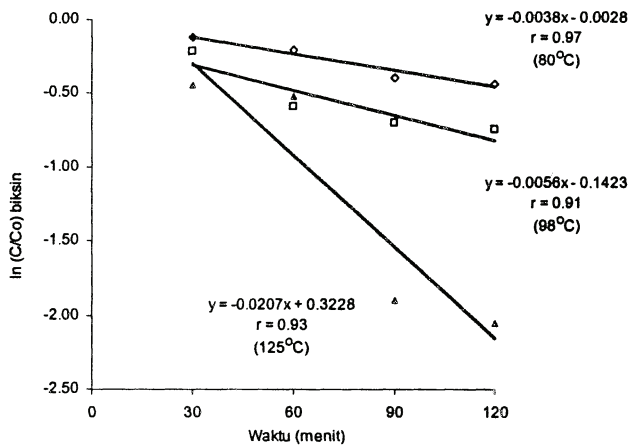
	Pemanasan (% relatif)		
	80 °C	98 °C	125 °C
Bixsin yang terdegradasi	25%	46 %	53 %
All-trans-bixsin yang terbentuk	11 %	13 %	9 %
Senyawa C17 yang terbentuk	-	1 %	25 %

Hasil analisis bixsin menggunakan HPLC pada pemanasan suhu 80, 98 dan 125 °C selama 120 menit tampak pada Gambar 1, masing-masing menunjukkan beberapa puncak pada panjang gelombang 450 nm. Senyawa acuan (A) menunjukkan puncak senyawa *cis*-bixsin. Hasil ini mengindikasikan bahwa pemanasan *cis*-bixsin menyebabkan terbentuknya senyawa all-*trans*-bixsin dan C17. All-*trans*-bixsin yang terbentuk pada suhu 80 °C sebanyak 11%. Dengan meningkatnya suhu menjadi 98 °C pembentukan all-*trans*-bixsin meningkat menjadi 13%, sedangkan pada 125 °C pembentukan all-*trans*-bixsin menurun menjadi 9%. Hal ini disebabkan terbentuknya senyawa C-17 dan isomerisasi bixsin. Senyawa C17 pada pemanasan bixsin 80 °C belum terbentuk tetapi pada pemanasan 98 dan 125 °C terbentuk berturut-turut sebesar 1% dan 25%. Bixsin yang dipanaskan pada 125 °C diamati pada panjang gelombang 435 nm. Hasil

menunjukkan bahwa puncak nomor 1 makin meningkat yang membuktikan bahwa puncak 1 adalah senyawa C-17 (Scotter, dkk., 2002). Rios, dkk. (2005) melaporkan bahwa produk degradasi bixsin oleh panas menghasilkan isomer-isomer bixsin seperti all-*trans*-bixsin, di-*cis*-bixsin dan C-17. Menurut McKeown (1963) yang dikuatkan oleh Scotter (1995) degradasi bixsin oleh panas menghasilkan senyawa asam-4,8-dimetil-tetradekaheksaena-dioat-monometil-ester (C-17), *m-xilen* dan toluena. Menurut Rios, dkk. (2005), senyawa *cis*-bixsin selama pemanasan berubah menjadi di-*cis*-bixsin ($E_a \sim 15$ kkal/mol), sebaliknya di-*cis*-bixsin mudah kembali menjadi senyawa *cis*-bixsin ($E_a \sim 3$ kkal/mol). Pemanasan lebih lanjut di-*cis*-bixsin (6,5 kkal/mol) membentuk isomer C-17. Perubahan *cis*-bixsin menjadi all-*trans*-bixsin membutuhkan $E_a \sim 24$ kkal/mol.

Kinetika Degradasi Panas Bixsin

Percobaan kinetika degradasi panas pada bixsin hendak menentukan konstanta kecepatan degradasi bixsin. Degradasi bixsin ditentukan dengan menggunakan grafik regresi linier. Data perhitungan koefisien korelasi (r) degradasi bixsin antara penurunan konsentrasi ($\ln C/C_0$ bixsin) terhadap lama pemanasan pada suhu 80, 98, dan 125 °C berturut-turut adalah 0,97; 0,91; dan 0,92 (Gambar 2). Nilai koefisien korelasi yang tinggi dari suhu tersebut menunjukkan korelasi yang erat antara degradasi pemanasan pada suhu 80, 98, dan 125 °C selama 120 menit dengan terjadinya perubahan warna dari merah menjadi kuning.

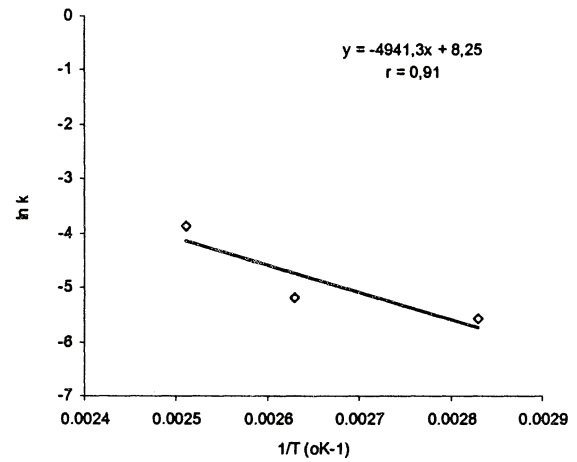


Gambar 2. Penurunan konsentrasi (ln C/Co biksin) terhadap lama pemanasan pada suhu 80, 98, dan 125 °C. Analisis menggunakan HPLC

Gambar 2 menunjukkan degradasi biksin mengikuti persamaan ordo pertama, karena nilai korelasinya linier (0,97; 0,91 dan 0,93). Nilai konstanta kecepatan degradasi panas biksin dihitung menggunakan rumus Arrhenius atau menggunakan nilai slop pada pemanasan suhu 80, 98, dan 125 °C berturut-turut adalah $3,8 \times 10^{-3}$; $5,6 \times 10^{-3}$; dan $2,1 \times 10^{-2}$ menit⁻¹. Hasil ini menunjukkan bahwa nilai konstanta kecepatan degradasi biksin pada suhu 125 °C adalah 5,5 kali lebih cepat dibanding degradasi biksin pada suhu 80 °C. Sedangkan nilai konstanta kecepatan degradasi biksin pada suhu 125 °C adalah 3,8 kali lebih cepat dibanding kecepatan degradasi biksin pada suhu 98 °C. Percepatan degradasi biksin berturut-turut terjadi pada suhu 80, 98, dan 125 °C. Chen dan Chen (1994) melaporkan bahwa konstanta kecepatan degradasi 2-karoten pada suhu 150 °C diperoleh sebesar $1,25 \times 10^{-2}$ menit⁻¹. Konstanta kecepatan degradasi lutein (karotenoid) pada pemanasan suhu 75, 85, dan 95 °C berturut-turut adalah $3,8 \times 10^{-2}$; $1,32 \times 10^{-1}$; dan $2,68 \times 10^{-1}$ jam⁻¹ (Henry dkk., 1998). Lee dan Chen (2002), melaporkan bahwa konstanta kecepatan degradasi likopen pada pemanasan suhu 50, 100, dan 150 °C berturut-turut adalah $7,5 \times 10^{-3}$; $1,24 \times 10^{-2}$; dan $1,651 \times 10^{-1}$ menit⁻¹.

Percobaan penentuan energi aktivasi hendak menetapkan besarnya energi kinetika yang berubah menjadi energi potensial saat terjadi tumbukan molekul yang mengawali reaksi pada suhu 80, 98, dan 125 °C. Persamaan Arrhenius (Taoukis, dkk., 1997) dan teori keadaan transisi dapat digunakan untuk menentukan pengaruh suhu terhadap konstanta kecepatan reaksi. Dari Gambar 34 diperoleh persamaan regresi linier dengan slop -4941,3. Persamaan Arrhenius menyatakan bahwa energi aktivasi merupakan hasil perkalian antara slop dengan tetapan gas universal ($R=1,9872$ kal/mol), sehingga dengan persamaan $\ln k = \ln A - Ea / R$

dapat dihitung energi aktivasi (Ea) = -(-) 4941,3 x 1,9872 kal/mol atau $Ea = 9,82$ kkal/mol.

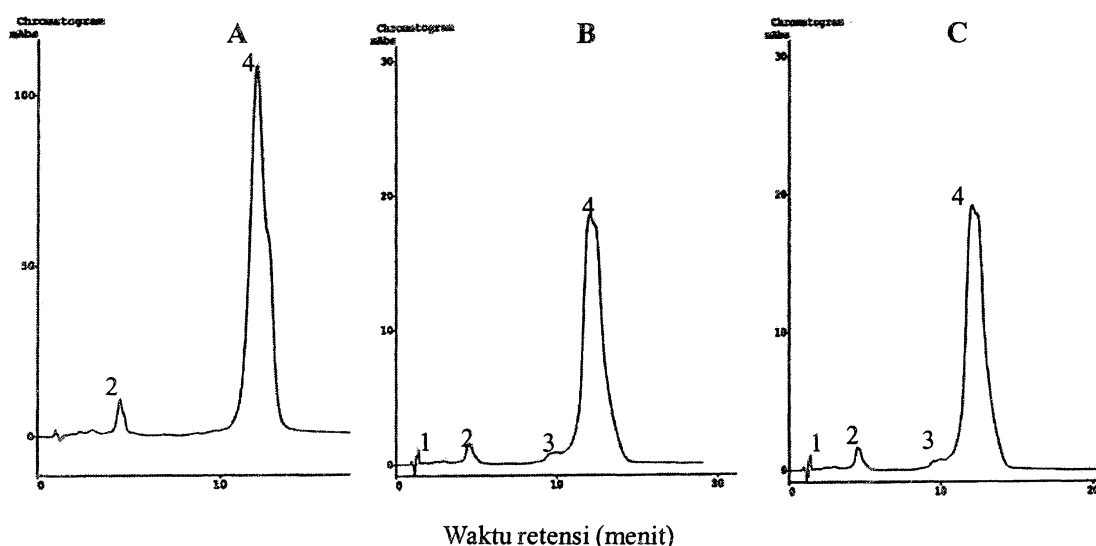


Gambar 3. Penurunan konstanta kecepatan degradasi biksin pada kenaikan nilai 1/T

Berdasarkan perhitungan menggunakan rumus Arrhenius diperoleh nilai energi aktivasi untuk mendegradasi biksin pada suhu 80, 98, dan 125 °C sebesar 9,82 kkal/mol. Menurut Scotter, dkk. (2001) nilai energi aktivasi degradasi biksin yang dipanaskan pada titik didih alkohol sebesar 8,5 kkal/mol, sedangkan Berset dan Marty (1986) melaporkan bahwa energi aktivasi degradasi biksin pada suhu yang sama adalah 30 kkal/mol. Hasil penelitian lain, Montenegro, dkk. (2004) melaporkan energi aktivasi biksin sebesar 6 kkal/mol. Perbedaan nilai energi aktivasi ini disebabkan oleh perbedaan sistem, suhu, dan pelarutnya.

Degradasi Biksin Selama Pencahayaan

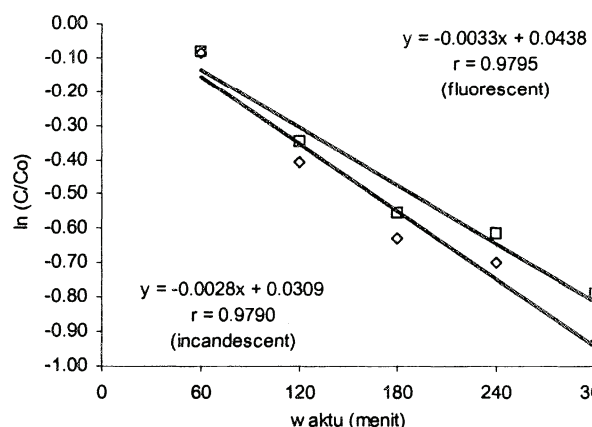
Hasil analisis dengan HPLC menunjukkan bahwa cahaya *incandescent* dan *fluorescent* dapat membentuk senyawa *all-trans*-biksin yang besarnya terlihat pada Gambar 4 dan Tabel 3. Degradasi biksin yang diinduksi oleh cahaya *fluorescent* lebih besar daripada degradasi oleh cahaya *incandescent*, sedangkan *all-trans*-biksin yang terbentuk akibat pencahayaan *fluorescent* lebih kecil dibandingkan cahaya *incandescent*, karena pada pencahayaan *fluorescent* *all-trans*-biksin lebih cepat diubah menjadi senyawa C-17 daripada pencahayaan *incandescent* sehingga senyawa C-17 yang dihasilkan oleh pencahayaan *fluorescent* lebih besar daripada pencahayaan *incandescent*. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa degradasi yang diinduksi oleh cahaya *incandescent* maupun *fluorescent* menghasilkan komponen yang sama dengan produk degradasi panas. Menurut Chen dan Chen (1994), kelompok karotenoid seperti likopen selama pencahayaan dan degradasi pemanasan menunjukkan produk degradasi yang sama.



Gambar 4. Kromatogram (A) standar biksin dan biksin sesudah pencahayaan (B) fluorescent dan (C) incandescent selama 5 jam, eluen asetonitril: 2% asam asetat aqueous (65 : 35), dideteksi pada panjang gelombang 450 nm menggunakan HPLC kolom Shim-pack CLC-ODS 2 C-18 (1: C17, 2: tidak diketahui; 3: all-trans-biksin; 4: cis-biksin)

Tabel 3. Prosentase biksin yang terdegradasi dan all-trans-biksin yang terbentuk akibat pencahayaan biksin (Metode HPLC)

	Pencahayaan (% relatif)	
	Incandescent	Fluorescent
Biksin yang terdegradasi	6 %	5 %
All-trans-Biksin yang terbentuk	1,7 %	1,6 %
Senyawa C17 yang terbentuk	0,08%	0,09%



Gambar 5. Penurunan konsentrasi ($\ln C/Co$ biksin) terhadap lama pencahayaan incandescent dan fluorescent pada biksin. Analisis menggunakan HPLC.

Laju Degradasi Biksin Selama Pencahayaan

Data perhitungan koefisien korelasi (r) antara penurunan konsentrasi ($\ln C/Co$ biksin) terhadap lama pencahayaan pada degradasi biksin akibat pencahayaan *incandescent* dan *fluorescent* berturut-turut 0,9790 dan 0,9795. Nilai koefisien korelasi menunjukkan hubungan yang erat antara penurunan konsentrasi biksin dengan lama pencahayaan baik yang dikenai cahaya *incandescent* maupun *fluorescent*. Nilai koefisien korelasi yang cukup tinggi dan nilai slop yang relatif sama pada kedua cahaya ini menunjukkan kemampuan cahaya *incandescent* maupun *fluorescent* mendegradasi biksin hampir sama. Kedua cahaya tersebut mengakibatkan terjadinya pemucatan warna biksin selama pencahayaan 300 menit.

Gambar 5 menunjukkan bahwa konstanta laju degradasi biksin pada cahaya *incandescent* dan *fluorescent* berturut-turut $2,8 \times 10^{-3}$ dan $3,3 \times 10^{-3}$ menit^{-1} . Hal ini menunjukkan selama pencahayaan *fluorescent* terjadi degradasi biksin yang lebih cepat dibandingkan apabila menggunakan cahaya *incandescent*. Jiang dan Kamal-Eldin (1998); dan Yang, dkk. (2002) melaporkan bahwa pencahayaan *fluorescent* selama 4 jam telah menghasilkan oksigen singlet. Cahaya *fluorescent* lebih efisien dibandingkan *incandescent* pada intensitas pencahayaan yang sama karena cahaya *fluorescent* lebih

mampu mengubah energi listrik menjadi energi cahaya daripada energi panas (Anonim, 2006(b); Min dan Boff, 2002; Satter dan deMan, 1975).

KESIMPULAN

Konstanta laju degradasi biksin dalam pelarut etanol yang dipanaskan pada suhu 80, 98 dan 125 °C selama 120 menit berturut-turut adalah $3,8 \times 10^{-3}$; $5,6 \times 10^{-3}$ dan $2,1 \times 10^{-2}$ menit⁻¹, sedangkan biksin yang terdegradasi berturut-turut sebesar 25%, 46% dan 53%. Konstanta laju degradasi biksin selama pencahayaan *incandescent* dan *fluorescent* relatif sama berturut-turut adalah $2,8 \times 10^{-3}$ dan $3,3 \times 10^{-3}$ menit⁻¹, sedangkan biksin terdegradasi berturut-turut sebesar 6% dan 5%. Energi aktivasi biksin terhitung sebesar 9,82 kkal/mol. Senyawa all-trans-biksin merupakan hasil degradasi biksin baik oleh panas maupun cahaya *incandescent* maupun *fluorescent*.

Ucapan Terimakasih

Penulis berterima kasih kepada Prof. Michael J. Scotter (Central Science Laboratory, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Sand Hutton, York YO41 1LZ, UK) untuk bantuan senyawa acuan all-trans-biksin dan 9-cis-biksin dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2006(a). <http://www.specialchem4coatings.com/tc/color/index.aspx?id=illuminant>.
- Anonim. 2006(b). <http://www.specialchem4coatings.com/tc/color/index.aspx?id=illuminant>
- Bittencourt, C., Felicissimo, M. P., Pireaux, J. J. dan Houssiau, L. 2005. Study of Annatto from *Bixa orellana* Seeds : An application of Time-of-flight Secondary Ion Mass Spectrometry. *Spectroscopyeurope*. Vol. 17 No. 2
- Berset, C. dan Marty, C. 1986. Utilisation Potentielle de l'Annatto en Caisson-Extrusion. *Lebensm. Wiss. Technol.* 19: 126-131.
- Bonnie, T. Y. dan Choo, Y. 1999. Oxidation and Thermal Degradation of Carotenoids. *J. of Oil Palm Research*. 2: 62-78
- Britton, G. 1998. Overview of Carotenoid Biosynthesis. In *Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism*: Britton, G., Liaaen Jensen, D. Pfander, H. Eds.: Basel. 3:13-147.
- Chen, T. M. dan Chen, B. H. 1994. Oportimization of Mobile Phases for HPLC of *cis-trans* Carotene Isomers. *Chromatographia*. 39: 346-3354.
- Di Mascio, P., Kaiser, S. dan Sies, H. 1989. Lycopene as The Most Efficient Biological Carotenoid Singlet Oxygen Quencher. *Archives of Biochem. Biophys.* 274: 532-538
- Haila, K. M., 1999. Effects of Carotenoids and Carotenoids-Tocopherol Interaction on Lipid Oxidation In vitro. *Academic Dissertation*. University of Helsinki.
- Departement of Applied Chemistry and Microbiology.
- Henry, L. K., Catignani, G. L. dan Schwartz, S. J. 1998. Oxidative Degradation Kinetics of Lycopene, Lutein, and 9-cis- and all-trans-²-carotene. *J. Assoc. Oil Chem. Soc.* 75: 823-829.
- Jiang, J. dan Kamal-Eldin, A. 1998. Comparing Methylene Blue-Photosensitized Oxidation of Methyl-Conjugated Linoleate and Methyl Linoleate. *J. Agric. Food Chem.* 46: 923-927.
- Lee, M. T dan Chen, B. H. 2002. Stability of Lycopene During Heating and Illumination in a Model System. *Food Chem.* 78: 425-432.
- McKeown, G. G. 1963. The Composition of Oil Soluble Annatto Food Colors. 2. Thermal Degradation of Bixin. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* 46: 790-796.
- McKeown, G. G. 1965. The Composition of Oil Soluble Annatto Food Colors. 3. Structure of The Yellow Pigment Formed by Thermal degradation of Bixin. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* 48: 835-857.
- Mercadante, A. Z., Steck, A. dan Pfander, H. 1997. Isolation and Identification of New Apocarotenoids from Annatto (*Bixa orellana*) Seeds. *J. Agric. Food Chem.* 45: 1050-1054.
- Min, D.B. dan Boff, J.M. 2002. Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Comprehensive Rev in Food Sci and Food Safety*. 1:58-72
- Montenegro, M. A., deO Rios, A., Mercadante, A. Z., Nazareno, M. A. dan Boraselli, C. D. 2004. Model Studies on The Photosensitized Isomerization of Bixin. *J. Agric. Food Chem.* 52: 3676-373.
- Najar, S. V., Bobbio, F.O. dan Bobbio, P. A. 1988. Effects of Light, Air, Anti-oxidants and Pro-oxidants on Annatto Extracts (*Bixa orellana*). *Food Chem.* 29: 283-289.
- Palozza, P. dan Krinsky, N. I. 1992. Effects of²-carotene and \pm -tocopherol on Radical-Initiated Peroxidation Microsomes. *Free. Rad. Biol. Med.* 13: 127-136.
- Rios, A. D. O., Borsarelli, C. D. dan Mercadante, A. Z. 2005. Thermal Degradation Kinetics of Bixin in an Aqueous Model System. *J. Agric. Food Chem.* 53: 2307-2311.
- Satter, A. dan deMan, J. M. 1975. Photooxidation of Milk and Milk Products. *CRC. Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 7: 13-37.
- Scotter, M. J. 1995. Characterisation of The Coloured Thermal Degradation Products of Bixin from Annatto and A Revised Mechanism for Their Formation. *Food Chem.* 53: 177-185.
- Scotter, M. J., Wilson, L. A., Appleton, G. P. dan Castle, L. 1998. Analysis of Annatto (*Bixa orellana*) Food Coloring Components and Colored Thermal Degradation Products By High-Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detection. *J. Agric. Food. Chem.* 46: 1031-1038.

- Scotter, M. J., Castle, L. dan Appleton, G. P. 2001. Kinetics and Yields for The formation of Coloured and Aromatic Thermal Degradation Products of Annatto in Foods. *Food Chem.* 74: 365-375.
- Scotter, M. J., Castle, L., Honeybone, C. A. dan Nelson, C. 2002. Method Development and Analysis of Retail Foods for Annatto Food Colouring Material. *Food Additives and Contaminants.* 19:205-222.
- Stahl, W. dan Sies, H. 1996. Lycopene: A Biologically Important Carotenoid for Humans. *Arch. Biochem. Biophys.* 336: 1-9.
- Taoukis, P. S., Labuza, T. P. dan Saguy, I. S. 1997. *Kinetics of Food Deterioration and Shelf-Life Prediction.* In Valentas, K. J., E. Rotstein and R. P. Singh, editor. 1997. *Handbook of Food Engineering Practice.* CRC Press LLC, New York.
- Yang, W. T., Lee, J. H. dan Min, D. B. 2002. Quenching Mechanisms and Kinetics of Alpa Tocopherol and Beta Carotene on the Photosensitizing Effect of Synthetic Food Colorant FD & Red No.3. *J. Food Sci.* 67: 507-510.