

TOKSISITAS AKUT PADA MENCIT (*Mus musculus*) DARI KONSENTRAT KAROTEN KELAPA SAWIT HASIL PROSES TERPADU *SOLVOLYTIC MICELLIZATION* DAN DESTILASI MOLEKULER

Hasrul Abdi Hasibuan, Donald Siahaan, dan Imam Bagus Sumantri¹⁾

Abstrak Minyak sawit mentah mengandung 500-700 ppm karoten. Karoten bermanfaat dalam produk pangan dan farmasi sebagai antioksidan. Begitupun karoten sengaja dihilangkan pada proses rafinasi sehingga penjumlahan karoten perlu dilakukan untuk meningkatkan nilai tambah. Pada penelitian ini, penjumlahan karoten minyak sawit dilakukan dengan integrasi proses: transesterifikasi minyak sawit menjadi metil ester untuk memudahkan penjumlahan karoten, *solvolytic micellization* 3 tahap untuk pemisahan karoten dari ester dan destilasi molekuler menggunakan *short part distillation* untuk pemurnian. Integrasi proses tersebut menghasilkan konsentrat karoten berkadar 60.000 ppm.

Untuk keamanan pangan, uji toksisitas dilakukan untuk menilai gejala toksik dan menentukan nilai dosis yang menimbulkan kematian (LD_{50}). Uji toksisitas konsentrat karoten menggunakan mencit (*Mus musculus*) putih galur swiss albino yang dikelompokkan dalam 7 perlakuan dosis oral, masing-masing 5 ekor jantan dan 5 ekor betina: kontrol, tanpa diberi apa-apa, diberi konsentrat karoten 0,9225 mg/kg berat badan (BB), diberi konsentrat karoten 31,62 mg/kg BB, diberi konsentrat karoten 100 mg/kg BB, diberi konsentrat karoten 316,2 mg/kg BB, diberi konsentrat karoten 1000 mg/kg BB, diberi konsentrat karoten 3162 mg/kg BB. Pemberian konsentrat karoten dilakukan secara oral dosis tunggal. Hasil analisis menunjukkan bahwa hingga hari ke-7 tidak ada yang menimbulkan kematian pada

setiap perlakuan dosis. Secara fisiologis, pada dosis 0,9225-316,2 mg/kg BB tidak ada perubahan dibandingkan kontrol sedangkan dosis 1000 dan 3162 mg/kg BB, mencit mengalami diare akut. Hasil pemeriksaan histopatologi menunjukkan bahwa hingga pemberian dosis 3162 mg/kg BB tidak mempengaruhi organ dalam hewan uji. Hasil uji toksisitas konsentrat karoten 60.000 ppm menunjukkan bahwa nilai LD_{50} adalah > 3162 mg/kg BB.

Kata kunci: karoten, minyak sawit, toksisitas akut, mencit

Abstract Crude Palm Oil contains 500-700 ppm of carotenes that very useful in food and pharmaceutical products as antioxidant. However carotenes are eliminated in refinement processes of the oil, then recovery of carotenes should increase the added value. In this study, the recovery of carotenes from palm oil conducted by integrating the process of transesterification to convert the oil into methyl esters so carotenes more easily extracted, *solvolytic micellization* up to 3 stages for separation of carotenes from the esters and molecular distillation for purification from ester using *short part distillation*. The carotenes concentrate obtained by the integrating process was 60.000 ppm.

To comply with food safety standards, toxicity test should be conducted to evaluate the toxic symptoms and determine the value of Lethal Dose (LD_{50}). Toxicity tests was conducted using mice (*Mus musculus*) Swiss white albino strains which were grouped into 7 oral treatment single doses consisted of 5 male and 5 female mice: 0 (control); 0.9225; 31.62; 100; 316.2; 1000 and 3162 mg/kg body weight (wb). The results of analysis show that up to 7 days no one caused of death in each dose. Physiologically, at doses from 0.9225 to 316.2 mg/kg no change compared to controls, while

Penulis yang tidak disertai dengan catatan kaki instansi adalah peneliti pada Pusat Penelitian Kelapa Sawit

¹⁾ Fakultas Farmasi, Universitas Sumatera Utara
Jl. Bioteknologi No.1 Kampus USU, Medan 20155

Hasrul Abdi Hasibuan (✉)
Pusat Penelitian Kelapa Sawit
Jl. Brigjen Katamso No 51 Medan, Indonesia
email:

doses of 1000 and 3162 mg/kg (wb), mice were experiencing acute diarrhea. Histopathology examination show that the dosage to 3162 mg/kg does not affect the internal organs of test animals. So, LD₅₀ value of the carotene concentrate of 60.000 ppm of was higher than 3162 mg/kg.

Keywords : acute toxicity, carotenes, palm oil, mice

PENDAHULUAN

Minyak sawit mentah mengandung karoten sebesar 500-700 ppm (Siahaan *et al.*, 2008). Jenis karoten yang dikandung minyak sawit sekitar 90% adalah α -karoten dan β -karoten. Keduanya memiliki aktifitas provitamin A yang tinggi dan nilainya 15 kali lebih besar dari retinol wortel dan 300 kali lebih besar dari retinol tomat (Choo, 2003). β -karoten dan α -karoten, secara umum diketahui untuk mengurangi radikal bebas. Radikal bebas dapat menyebabkan kerusakan sel yang bersifat karsinogenik (Katrin *et al.*, 2005).

Tahun 2009, produksi minyak sawit mentah Indonesia mencapai 19,2 juta ton (Direktorat Jenderal Perkebunan, 2009). Berdasarkan estimasi dari jumlah tersebut, karoten yang dapat dihasilkan berkisar 9.600-13.440 ton. Sayangnya, karoten tersebut dibuang atau sengaja dihilangkan pada pengolahannya menjadi minyak goreng. Apabila karoten dari minyak sawit dapat diekstraksi, tentunya akan memberikan nilai tambah yang relatif besar bagi industri minyak sawit. Selain itu, karoten tersebut dapat dimanfaatkan untuk penanggulangan masalah kekurangan vitamin A, zat warna alami dan sebagai suplemen makanan yang sangat bermanfaat untuk meningkatkan kesehatan masyarakat.

Beberapa teknologi telah dikembangkan untuk mengekstraksi karoten dari minyak sawit. Pusat Penelitian Kelapa Sawit (PPKS) telah mengembangkan teknologi ekstraksi karoten dari minyak sawit dengan teknik terpadu antara *solvolytic micellization* (SM) dan molekuler destilasi yang menghasilkan konsentrat karoten > 50.000 ppm (Pusat Penelitian Kelapa Sawit, 2008).

Dalam memenuhi standar keamanan pangan, konsentrat karoten yang dihasilkan dari bahan alam haruslah memenuhi standar sehingga uji keamanan/toksitas perlu dilakukan. Uji toksitas suatu bahan alam dilakukan dengan uji pra-klinik (dengan hewan

coba). Uji toksitas ini meliputi toksitas akut, sub-kronis, kronis dan uji toksitas khusus (teratogenik, mutagenik dan uji toksik lainnya) (Wahyono *et al.*, 2007).

Pengujian toksitas akut adalah suatu pengujian untuk menetapkan potensi toksitas akut LD₅₀, menilai berbagai gejala toksik, spektrum efek toksik, dan mekanisme kematian (Angelina *et al.*, 2008 dan Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008). LD₅₀ atau dosis letal median adalah dosis yang menimbulkan kematian pada 50% individu (Arini *et al.*, 2007; dan Shayne, 2002).

Choo (1992) telah melakukan studi toksitas karoten sawit berkadar 20.000 ppm pada tikus. Hasil uji histopatologinya ditunjukkan bahwa konsentrat karoten tidak mempengaruhi hati, lambung, jantung, paru-paru, adrenal, ginjal dan limpa sehingga disimpulkan bahwa konsentrat karoten sawit tidak berbahaya (Basiron *et al.*, 2000). Selain itu, karoten tidak memberikan sifat mutagenik dan berdasarkan uji toksitas kronis menunjukkan bahwa karoten tidak menimbulkan sifat karsinogenik dan tumorigenik (Heywood *et al.*, 1985). Namun, kelebihan konsumsi karotenoid menyebabkan toksitas akut pada beberapa hewan. Indikasi gejala toksis berupa hidrosepalus ringan, penurunan berat, mual, iritasi, kerontokan rambut, dll (Tillman *et al.*, 1986).

Berdasarkan uraian di atas, maka penelitian ini dilakukan untuk menentukan toksitas akut dari konsentrat karoten sawit yang dihasilkan oleh PPKS. Dengan uji ini dapat diperoleh informasi tentang batas toksik konsentrat karoten sawit.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Minyak sawit mentah diperoleh dari PT. Perkebunan Nusantara IV, Adolina. Bahan-bahan lain yang digunakan adalah metanol dan KOH *industrial grade*, n-heksan p.a dari E.Merk. Bahan-bahan lain yang digunakan adalah formalin teknis 10% dan akuades *industrial grade*.

Penyediaan Sampel Uji

Minyak sawit mentah (karoten 500-600 ppm) ditransesterifikasi dengan menambahkan metanol dengan rasio mol 1:6. Katalis yang digunakan adalah

kalium hidroksida sebesar 1 - 2% (b/b). Campuran dipanaskan pada suhu 60-70°C dan diaduk selama 2 jam. Gliserol dipisahkan dari lapisan ester. Ester yang dihasilkan masih mengandung karoten 500-600 ppm. Karoten dipisahkan dari ester dengan menambahkan pelarut metanol (yang mengandung air 2-4%) dengan rasio 1:5 dengan 3 tahapan (Pusat Penelitian Kelapa Sawit, 2008). Karoten hasil teknik SM tersebut kemudian dipurifikasi menggunakan SPD pada suhu 150-170°C dan tekanan 0,01-0,1 mbar.

Analisa Konsentrat Karoten

Analisa konsentrat karoten meliputi kadar karoten dan kadar ester. Kadar karoten ditentukan menggunakan spektrofotometer UV-VIS dengan metode MPOB p2.6:2004 (MPOB, 2004). Sedangkan kadar ester ditentukan menggunakan kromatografi gas menggunakan metode *MPOB test method c2. 11* (MPOB, 2004).

Uji Toksisitas Konsentrat Karoten

Hewan uji yang digunakan adalah mencit putih galur swiss albino yang diperoleh dari Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan Republik Indonesia (Balitbangkes, Depkes RI) Jakarta. Jenis kelamin hewan uji adalah jantan dan betina dengan berat badan 20-30 gram, usia 2-4 bulan (Wahyono *et al.*, 2007). Mencit diaklimatisasi selama 2 minggu di laboratorium dengan 12 jam terang dan 12 jam gelap (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008 dan Shayne, 2002). Makanan dan minuman diberikan secukupnya.

Mencit dibagi menjadi 7 kelompok, tiap kelompok terdiri dari 5 ekor jantan dan 5 ekor betina. Pengelompokan dosis dihitung berdasarkan *probit-log doses* (Shayne, 2002). Perlakuan pada masing-masing kelompok adalah sebagai berikut:

1. Kontrol, tanpa diberi apa-apa
2. Diberi karoten 0,9225 mg/kg BB secara oral dosis tunggal
3. Diberi karoten 31,62 mg/kg BB secara oral dosis tunggal
4. Diberi karoten 100 mg/kg BB secara oral dosis tunggal
5. Diberi karoten 316,2 mg/kg BB secara oral dosis tunggal

6. Diberi karoten 1000 mg/kg BB secara oral dosis tunggal

7. Diberi karoten 3162 mg/kg BB secara oral dosis tunggal

Pada kelompok ke-7 dosis 3.162 mg/kg BB merupakan dosis tertinggi dan maksimal yang diberikan pada hewan percobaan dengan karoten 60.000 ppm (pada mencit maksimal pemberian secara oral = 50 ml/kg BB (Michael, 2000)).

Hewan uji diamati pada 4 jam pertama dan 24 jam kemudian. Pengamatan dilanjutkan pada hari-hari berikutnya selama 7 hari pada waktu yang sama. Pengamatan yang dilakukan meliputi bobot badan, keadaan fisiologis, dan reaksi lain seperti : kejang, dan jumlah kematian (Angelina *et al.*, 2008 dan Shayne, 2002).

Pada hari terakhir hewan uji dibedah, diamati dan ditimbang organ-organ vitalnya yaitu jantung, paru-paru, usus, lambung, ginjal dan hati (Angelina *et al.*, 2008). Setelah organ dikeluarkan dari tubuh mencit putih maka dilakukan pembuatan preparat organ dengan langkah sebagai berikut: sampel organ yang telah diambil lalu difiksasi dengan larutan formalin 10% selama 3-4 jam. Setelah itu dilakukan dehidrasi dengan aseton sebanyak 3 kali, masing-masing selama 2 jam. Organ dilakukan *cleaning* (pembersihan) dengan menggunakan toluen sebanyak 3 kali, masing-masing selama 1-2 jam. Lalu dilakukan proses *embedding* yaitu perendaman sampel dalam paraffin cair dengan suhu 60-70°C sebanyak 3 kali, masing-masing selama 2 jam, lalu dilakukan proses pencetakan blok paraffin dan pewarnaan.

Penentuan LD₅₀ menggunakan probit. Apabila tidak terjadi kematian hewan uji maka hasil toksisitas akut dapat ditentukan tingkatan toksisitasnya. Parameter lain seperti berat badan dan berat organ vital dianalisis dengan menentukan rata-ratanya.

Jika terjadi kematian dosis LD₅₀ dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$m = a - b (\sum pi - 0,5)$$

Keterangan:

m = Log LD₅₀

a = Logaritma dosis terendah yang masih menyebabkan jumlah kematian 100% tiap kelompok

b = Beda logaritma dosis berurutan

pi = Jumlah hewan yang mati menerima dosis dibagi dengan jumlah seluruh hewan yang menerima dosis (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Konsentrat Karoten

Pemisahan karoten dari metil ester sawit dengan teknik SM pada 3 tahap menghasilkan konsentrasi karoten berkadar 20.000 ppm dan mengandung ester sebesar 80-90%. Proses pemurnian konsentrat karoten menggunakan SPD menghasilkan konsentrat karoten berkadar 60.000 ppm dan mengandung ester <1%. Integrasi proses penjumlahan karoten tersebut menghasilkan perolehan kembali sebesar 50-60%.

Toksitas Konsentrat Karoten

Berdasarkan studi literatur bahwa karoten sangat bermanfaat bagi kesehatan. Namun, konsentrat karoten yang dihasilkan dari minyak sawit menggunakan integrasi proses SM dan SPD perlu dilakukan uji toksisitasnya. Uji toksisitas dilakukan untuk menentukan nilai LD_{50} , mengetahui gejala toksik dan mekanisme kematian hewan uji (mencit) yang timbul akibat asupan karoten hasil ekstraksi dari minyak sawit.

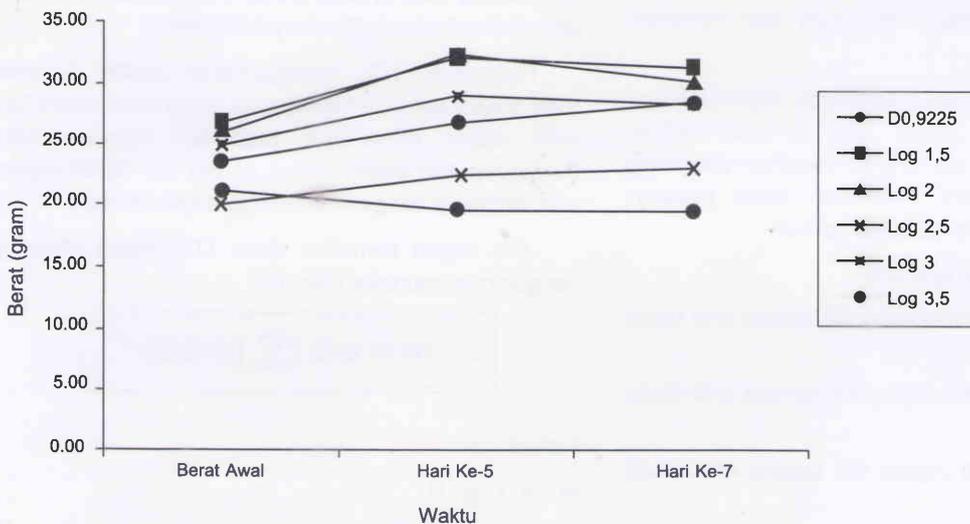
Pengaruh konsentrat karoten terhadap bobot mencit

Gambar 1 dan 2 menunjukkan perkembangan bobot badan mencit selama 7 hari setelah pemberian dosis tunggal oral bahan uji konsentrat karoten. Gambar 1 menunjukkan kurva perubahan bobot mencit jantan, dimana pada dosis 3.162 mg/kg BB terjadi penurunan bobot yang tidak signifikan. Hal ini disebabkan oleh terjadinya diare akut (Gambar 4). Sementara itu, pada Gambar 2 dapat dilihat kurva bobot mencit betina yang menunjukkan penurunan dari hari pertama hingga hari ke-5 namun terjadi *trend* peningkatan hingga hari ke-7.

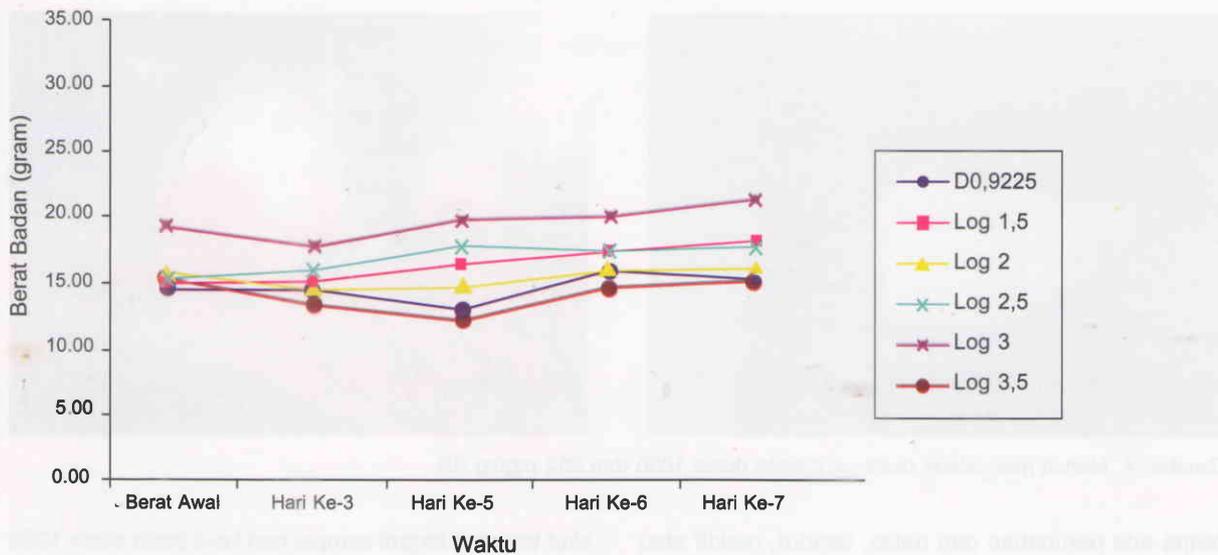
Dari hasil tersebut dapat dinyatakan bahwa dosis tunggal oral konsentrat karoten hingga dosis 3.162 mg/kg BB tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan atau perkembangan bobot badan mencit jantan maupun betina selama 7 hari. Katrin *et al.*, 2005 menyatakan bahwa penurunan bobot badan dalam sehari yang tidak mencapai 5% tanpa menunjukkan pengaruh perilaku pada hewan uji adalah umum terjadi akibat perlakuan dan bukan dikarenakan bahan uji.

Pengaruh konsentrat karoten terhadap fisiologis mencit

Pemberian karoten secara oral pada dosis tunggal 0,9225; 31,62; 100; 316,2; 1000 dan 3162 mg/kg BB menunjukkan bahwa karoten tidak mempengaruhi perilaku mencit jantan maupun betina. Perilaku (profil farmakologi) akibat pemberian dosis tunggal tersebut



Gambar 1. Perubahan bobot badan rata-rata (g) mencit jantan yang diamati selama 7 hari setelah pemberian dosis tunggal oral konsentrat karoten.



Gambar 2. Perubahan bobot badan rata-rata (g) mencit betina yang diamati selama 7 hari setelah pemberian dosis tunggal oral konsentrat karoten.

tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dibandingkan kontrol selama penelitian.

Pada dosis 1000 mg/kg BB menunjukkan perubahan warna bulu dari putih menjadi kekuningan. Hal yang sama juga ditunjukkan pada dosis 3.162 mg/kg BB bahkan kulit badan hewan uji berwarna kuning terang (Gambar 3). Namun, kondisi hewan tidak menunjukkan perubahan yang cukup berarti (tanda-tanda toksik lain seperti tertidur, reaktif, gerak lambat sampai kejang).

Perubahan warna tersebut terjadi disebabkan oleh hewan uji kelebihan karoten yang disebut dengan

karotenemia. Gejala yang ditimbulkan yaitu kulit menjadi kuning, dimulai dari telapak tangan, telapak kaki dan bagian tubuh lainnya (kecuali pada mata). Penggunaan secara oral karoten (1 mg/kg BB) dapat mengakibatkan kejadian tak langsung proses karotenemia pada wanita yang diakibatkan kemungkinan pengaruh genetik dalam metabolisme karotenoid (Svensson and Vahlquist, 1995).

Dari hasil pengamatan secara fisiologis, kondisi mencit dari dosis rendah 0,9225 - 316,2 mg/kg BB tidak menunjukkan perubahan fisiologis yang nyata secara visual (hewan masih bergerak normal dan lincah



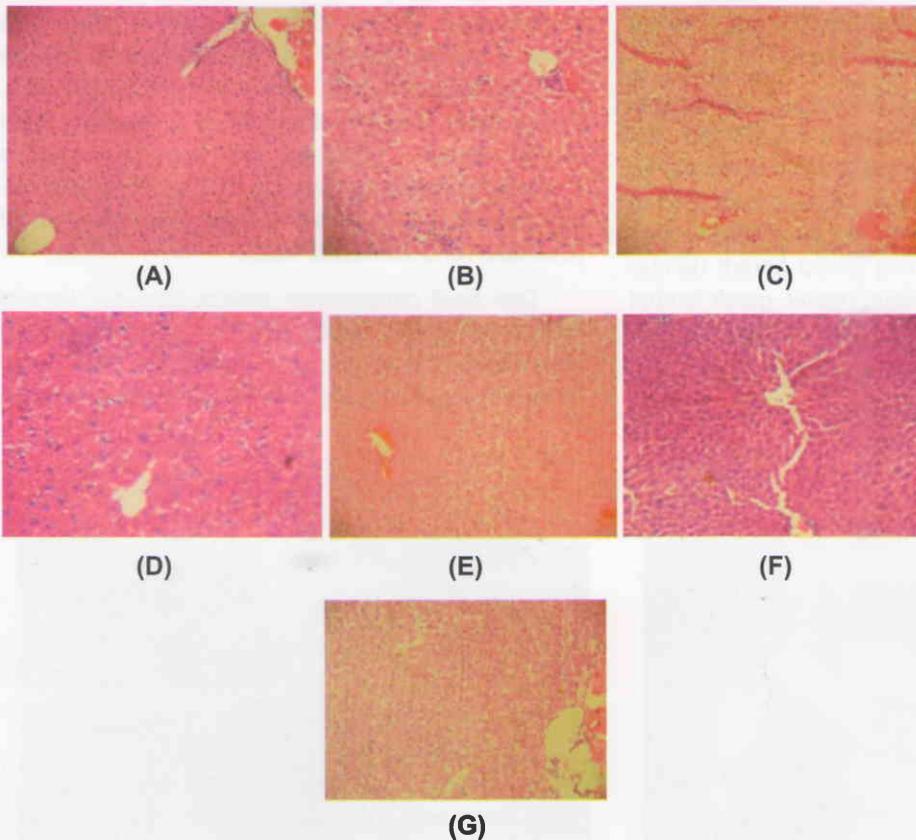
Gambar 3. Perubahan warna terjadi pada dosis 1000 dan 3162 mg/kg BB (B), kontrol (A).



Gambar 4. Mencit mengalami diare akut pada dosis 1000 dan 362 mg/kg BB.

tanpa ada perubahan dari nafas, tertidur, reaktif atau terjadinya kejang). Namun, pada dosis 1000 mg/kg BB dan dosis 3162 mg/kg BB terjadi perubahan fisiologis yaitu terjadi diare akut pada mencit (Gambar 4). Diare

akut tersebut terjadi sampai hari ke-3 pada dosis 1000 mg/kg BB dan hari ke-7 pada dosis 3162 mg/kg BB. pada kedua dosis pemberian ini, hewan kurang reaktif (kondisi kurang normal).



Gambar 5. Mikroskopik dari hati dengan perbesaran 10 x 10 yaitu Kontrol (A), Dosis rendah (0,09225 mg/kg BB) (B), Dosis Log 1,5 (31,6 mg/kg BB) (C), Dosis 2 (100 mg/kg BB) (D), Dosis Log 2,5 (316 mg/kg BB) (E), Dosis Log 3 (1000 mg/kg BB) (F), dan Dosis Log 3,5 (3162 mg/kg BB) (G).



Pengaruh pemberian konsentrat karoten terhadap organ dalam mencit

Data indeks organ yang diamati pada hari ke-7 setelah perlakuan menunjukkan bahwa tidak adanya perubahan bobot organ seperti jantung, ginjal, testis, usus, dan lambung. Namun, pemberian dosis tunggal oral konsentrat pada dosis 316,2; 1000; dan 3162 mg/kg BB mempengaruhi peningkatan bobot hati secara nyata ($P < 0,01$) dibandingkan dosis normal. Hal ini dikarenakan oleh karoten mempengaruhi sistem metabolisme hati pada hewan uji. Hasil pemeriksaan histopatologi organ pada hewan uji menunjukkan adanya perubahan pada tingkat seluler hati (Gambar 5). Hasil mikroskopik dengan perbesaran 10×10 terlihat terjadinya dilatasi sinusoid (rongga/celah yang melebar pada sel) tetapi tidak nyata dibandingkan dengan hewan kontrol dan hewan pemberian dosis rendah (0,9225 mg/kg BB). Dengan demikian, pemberian sediaan uji konsentrat karoten sampai dosis 3162 mg/kg BB tidak mempengaruhi organ hati dan organ lainnya (jantung, paru-paru, ginjal, testis, usus, dan lambung) dari hewan uji secara nyata.

Hal yang sama juga telah dilaporkan oleh Choo, 1992 dan Basiron *et al.*, 2000 bahwa konsentrat karoten berkadar 20.000 ppm tidak mempengaruhi organ-organ besar pada tikus *Sprague Dawley* seperti hati, lambung, adrenal, ginjal, hati dan limpa. Artinya, konsentrat karoten sawit tidak berbahaya.

Karoten merupakan zat pembentuk vitamin A atau provitamin A. Perubahan karoten menjadi vitamin A terjadi dalam dinding usus halus. Secara teoritis, satu molekul karoten akan terbelah membentuk dua molekul vitamin A, namun efisiensinya sangat rendah dibandingkan teorinya. Penyerapannya dalam usus dari *micelle* terjadi secara difusi pasif, kemudian digabungkan dengan kilomikron dan diserap melalui saluran limfatik, kemudian bergabung dengan saluran darah dan ditransportasikan ke hati. Di hati, vitamin A digabungkan dengan asam palmitat dan disimpan dalam bentuk retinil-palmitat (Burri and Clifford, 2004 dan Tillman *et al.*, 1986).

Nilai LD₅₀

Pemberian konsentrat karoten hingga dosis oral tunggal terbesar (3162 mg/kg BB) menunjukkan bahwa tidak ditemukan adanya kematian hingga hari ke-7. Dengan demikian, nilai LD₅₀ dari konsentrat karoten 60.000 ppm tidak dapat dihitung. Akan tetapi,

nilai LD₅₀ dinyatakan > 3162 mg/kg BB pada mencit jantan maupun betina. Dosis 3162 mg/kg BB pada mencit ini setara dengan dosis pada manusia dewasa (70 kg) 24,530 g atau 350,4 mg/kg BB manusia (Katrin *et al.*, 2005).

KESIMPULAN

Uji toksisitas akut konsentrat karoten sawit terhadap mencit jantan dan betina menunjukkan bahwa sampai dosis 3162 mg/kg bobot badan, tidak ada efek toksik yang nyata (tidak ada hewan uji yang mati sampai hari ke-7). Nilai LD₅₀ konsentrat karoten berkadar karoten 6% (60.000 ppm) adalah lebih besar 3162 mg/kg BB. Pada dosis tersebut juga tidak mempengaruhi perkembangan bobot badan dan bobot organ (jantung, hati, ginjal, testis, usus dan lambung) baik pada mencit jantan maupun betina. Dengan demikian, konsentrat karoten sawit tidak berbahaya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada PT. Perkebunan Nusantara IV sebagai penyandang dana penelitian melalui Penelitian Kerjasama 2008-2010. Ucapan terima kasih juga ditujukan kepada teknisi Kelompok Peneliti Pengolahan Hasil dan Mutu diantaranya Sabarida, Warnoto, Ijah, Alida dan Magindrin.

DAFTAR PUSTAKA

- Angelina, M., S. Hartati, I.D. Dewijanti, S.D.D. Banjarnahor, dan L. Meilawati. 2008. Penentuan LD50 daun cinco (*Cyclea barbata* miers.) pada mencit. *Makara Sains*.12(1) : 23-26.
- Arini, S., F.D. Suyatna, dan G. Sulistia. 2007. Pengantar farmakologi dalam farmakologi dan terapi. Penerbit FK-UI. Jakarta.
- Basiron, Y., B.S. Jalani And C. K. Weng. 2000. *Advances in oil palm research*. Volume II. Malaysian Palm Oil Board. pp. 1036-1043.
- Burri, B.J. and A.J.Clifford. 2004. Carotenoid and retinoid metabolism: insights form isotop studies. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 430: 110-119.

- Choo, Y.M., H.L.L. Nang, M.A. Ngan, and Y. Basiron. 2003. Extraction of palm vitamin E, phytosterol and squalen from palm oil. US. Patent 20050250953A1
- Direktorat Jenderal Perkebunan. 2009. Pemerintah akan membangun lembaga riset kelapa sawit berskala besar. <http://www.diperta.jabarprov.go.id>. diakses tanggal 23 Juni 2009
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2008. Farmakope Herbal Indonesia. hal: 54
- Heywood, R., A.K. Palmer, R.L. Gregson, and H. Humler. 1985. The toxicity of β -carotene. *J. Toxicology*. 36(2-3): 91-100
- Katrin, A.A. Soemardji, A.G. Soeganda dan I. Soediro. 2005. Toksisitas akut isolat fraksi n-heksana dan etanol daun dendrophthoe pentandra (L.) miq. yang mempunyai aktivitas imunostimulan, *Majalah Farmasi Indonesia*. 16(4): 227 - 231
- Michael. D.J. 2000. *Toxicologists Pocket Handbook*. CRC Press. pp. 9-23
- MPOB. 2004. *MPOB Test Method: A compendium of test on palm oil products, palm kernel products, fatty acids, food related products and others*. Malaysia. 194p
- Pusat Penelitian Kelapa Sawit. 2008. *Annual Report 2008*. Medan
- Shayne, G.C. 2002. *Drug safety evaluation*. John Wiley and Sons Inc. USA. Pp: 197-223
- Siahaan, D., H.A. Hasibuan, M. Rivani, and F.R. Panjaitan. 2008. Karakteristik CPO Indonesia. *Warta Pusat Penelitian Kelapa Sawit*. Vol. 16.(1): 27-37
- Svensson, A. and A. Vahlquist. 1995. Metabolic carotenemia and carotenoderma in a child. *Acta Derm Venereol*. 75(1): 70-71
- Tillman, A.D., H. Hartadi, S. Reksohadiprojo, S. Prawirokusuma, dan S. Lebdosekojo. 1986. *Ilmu makanan ternak dasar*. Gadjah Mada University Press. hal. 97
- Wahyono, L. Hakim, Nurlaila, M. Sulistio, dan R. Ilyas. 2007. Uji toksisitas akut ekstrak etanolik terstandar dari kulit akar senggugu (*Clerodendrum serratum* L. moon). *Majalah Farmasi Indonesia*. 18(1): 1 - 7