DETOKSIFIKASI DAN UJI TOKSISITAS AKUT LIMBAH BUNGKIL BIJI JARAK PAGAR TERHADAP TIKUS PUTIH

(Detoxification and Acute Toxicity Assay of Jatropha curcas Cake to Rats)

Oleh/ By :

R. Sudradjat¹⁾, D.W. Lussy²⁾ & D. Setiawan³⁾

ABSTRACT

Jatropha curcas meal are produced as a residue from biodiesel production. Several findings showed that the cake contains high protein content which can be used as an alternative protein supplement for livestock food, but the meal contains dangerous toxins such as saponins, lectin (curcin), tripsin inhibitors, and phorbol esters. The objectives of this research are : to detoxify the toxins, to determine the nutrient contents, and to observe the acute toxicity assay. Phytochemistry analysis shows that detoxification eliminates saponins and alkaloid compound. According to proximate analysis, some parameters such as ash, fat, and sugar content are affected by detoxification, while moisture, protein, and crude fiber are not. According to animal feed proximate standard, the cake are suitable for ruminant feed. Acute toxicity assay shows that there is no tested animal death, so it is concluded that the LD50 lays over 15 g/ kg dose of body weight is nontoxic.

Key words : Detoxification, toxicity assay, Jatropha curcas meal, rats.

ABSTRAK

Bungkil biji jarak pagar merupakan limbah dari produksi biodiesel. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa bungkil masih mengandung kadar protein yang tinggi sehingga dapat digunakan sebagai alternatif suplemen pakan ternak. Namun dikatakan juga bahwa bungkil biji jarak mengandung racun yang berbahaya seperti saponin, lektin (kursin), inhibitor tripsin dan ester forbol. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kandungan gizi, mendetoksifikasi racun dalam bungkil dan menguji toksisitas akut bungkil terhadap tikus putih. Analisis fitokimia menunjukkan bahwa detoksifikasi dapat mengurangi senyawaan saponin dan alkaloid contoh. Berdasarkan analisis proksimat, beberapa parameter seperti kadar abu, lemak dan gula pereduksi contoh dipengaruhi oleh detoksifikasi, sedangkan kadar air, protein dan serat kasar tidak dipengaruhi oleh detoksifikasi. Berdasarkan standar proksimat pakan ternak, ampas bungkil biji jarak cocok untuk pakan ruminansia. Uji toksisitas akut menunjukkan bahwa tidak ada kematian dari hewan coba, sehingga diduga LD50 di atas dosis 15 g/kg BB dan ampas bungkil biji jarak dapat digolongkan non toksik.

Kata kunci : Detoksifikasi, uji toksisitas, biji jarak pagar, tikus putih.

¹⁾ Peneliti pada Pusat Penelitian dan Pengembangan Hasil Hutan, Bogor

²⁾ Mahasiswa pada FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Bogor

³⁾ Teknisi pada Pusat Penelitian dan Pengembangan Hasil Hutan, Bogor

I. PENDAHULUAN

Jarak pagar merupakan tanaman yang tersebar luas di beberapa wilayah di Indonesia. Tanaman ini dapat menghasilkan minyak sebagai biodiesel untuk pengganti BBM (Sudradjat, 2006). Proses pembuatan biodiesel dari tanaman jarak pagar akan menghasilkan limbah berupa bungkil biji jarak pagar. Bungkil tersebut masih mengandung sisa-sisa minyak dan kandungan gizi terutama protein. Bungkil biji jarak pagar dapat dimanfaatkan untuk pupuk, produksi biogas dan untuk pakan ternak terutama dari varietas yang tidak beracun (Heyne, 1987). Menurut Becker dan Makkar (1998), bungkil biji jarak pagar memiliki kandungan nutrisi yang tinggi terutama protein yaitu sekitar 53 - 58%, sehingga dapat digunakan sebagai suplemen protein untuk pakan ternak jika racunnya telah dihilangkan.

Menurut Sinaga (2005), kandungan kimia kayu jarak pagar terdiri atas *n*-1-triakontanol, α -amirin, kampesterol, stigmasterol, β -sitosterol, isoviteksin, viteksin dan HCN. Daun dan batangnya mengandung saponin, senyawaan flavonoid, tanin dan polifenol. Getahnya mengandung tanin sebesar 11 - 18%. Bijinya mengandung senyawaan alkaloid, saponin dan sejenis protein beracun yaitu kursin. Biji jarak mengandung minyak yang terdiri atas berbagai trigliserida dari asam stearat, oleat, linoleat, palmitat dan sebagainya. Menurut Kulkarni *et al.* (2005), senyawa racun pada tumbuhan jarak pagar paling banyak ditemukan pada bijinya. Senyawa racun itu adalah kursin (lektin) yang merupakan molekul protein kompleks yang memiliki toksisitas tinggi. Senyawa toksik lain yang ditemukan dalam tumbuhan jarak pagar di antaranya adalah asam sianat (Kulkarni *et al.*, 2005), ester forbol, inhibitor tripsin, lektin (kursin) dan saponin (Makkar *et al.*, 1997), flavonoid, viteksin dan isoviteksin (Mourque *et al.*, 1961 diacu dalam Aregheore *et al.*, 2003) dan 12-deoksil-16-hidroksiforbol (Adolf *et al.*, 1984 diacu dalam Aregheore *et al.*, 2003). Toksisitas jarak pagar disebabkan oleh keberadaan ester forbol pada varietas beracun, sehingga tidak dapat digunakan sebagai bahan pakan. Adapun keberadaan lektin (kursin) dan inhibitor tripsin yang tinggi tidak berperan serta dalam toksisitas jangka pendek.

Kajian mengenai efek racun dari biji jarak pagar telah dilakukan pada beberapa hewan coba (Adam, 1974; Ahmed & Adam, 1979; El Balwi *et al.*, 1995; Liberalino *et al.*, 1988, diacu dalam Aregheore *et al.*, 2003). Hasilnya menunjukkan bahwa biji jarak pagar bersifat racun. Adapun racun yang berperan dalam toksisitas biji jarak pagar adalah ester forbol, inhibitor tripsin, lektin dan saponin (Makkar *et al.*, 1997). Efek racun dapat dilihat dari tingginya tingkat kematian hewan coba dan gejala klinis yang terjadi seperti diare, dehidrasi, mata cekung dan menurunnya kondisi tubuh hewan percobaan.

Sementara itu, kajian terhadap toksisitas bungkil biji jarak belum pernah dilakukan sebelumnya. Oleh karena itu, penelitian ini diarahkan untuk mengetahui toksisitas akut dari bungkil biji jarak dengan pengujian terhadap tikus putih. Kajian lebih lanjut dari penelitian ini adalah pemanfaatan bungkil biji jarak pagar sebagai alternatif pakan ternak. Sebelum dimanfaatkan sebagai pakan ternak, bungkil biji jarak perlu didetoksifikasi terlebih dahulu. Tujuannya adalah untuk menghilangkan senyawa-senyawa toksik dari bungkil biji jarak. Hasil penelitian ini diharapkan memberikan informasi yang bermanfaat tentang kelayakan sisa bungkil biji jarak untuk pakan ternak dilihat dari uji toksisitas yang dilakukan.

II. METODOLOGI

A. Bahan dan Alat

Bungkil biji jarak yang digunakan dalam penelitian ini adalah ampas bungkil sebelum dan setelah detoksifikasi. Ampas bungkil sebelum detoksifikasi adalah ampas bungkil yang hanya diekstraksi dengan cara maserasi, sedangkan ampas bungkil setelah detoksifikasi merupakan ampas bungkil yang mengalami perlakuan lebih lanjut setelah ekstraksi secara maserasi yaitu detoksifikasi. Hewan percobaan yang digunakan dalam uji toksisitas adalah tikus putih jantan galur *Sprague-Dawley*, dalam kondisi sehat, mempunyai aktivitas normal dan berusia 2 bulan. Bahan-bahan yang digunakan untuk detoksifikasi bungkil biji jarak adalah petroleum eter, akuades dan metanol 92%. Bungkil biji jarak pagar berasal dari Nusa Tenggara Barat. Bahan-bahan untuk uji fitokimia adalah HCl pekat, Mg, amil alkohol, kloroform, amonia, H_2SO_4 2M, pereaksi Meyer, metanol, $FeCl_3$ 1%, akuades, etanol, pereaksi Lieberman-Buchard, kertas saring, asam pikrat (2,4,6-trinitrofenol), $NaHCO_3$, dan toluena. Bahan-bahan untuk uji proksimat adalah bungkil biji jarak, H_2SO_4 pekat, selenium, asam borat 4%, indikator BCG-MM, HCl 0,02 N, petroleum benzena, H_2SO_4 1,25%, kertas saring *Whatman* 41, etanol 96%, etanol 70%, larutan *Luff Schoorl*, KI 20%, H_2SO_4 25%, $Na_2S_2O_3$ 0,1 N dan indikator pati.

Alat-alat yang digunakan adalah *blender*, cawan porselin, tanur, pembakar gas, piringan pemanas, alat destruksi protein, labu dan alat destilasi *Kjeltech*, seperangkat *saxlet* dan refluks, pendingin tegak, pompa vakum, oven, penangas air, eksikator, neraca analitik, penguap putar (*rotary evaporator*), *spot plate* dan alat-alat gelas lainnya.

B. Metode

Tahapan yang dilakukan dalam penelitian ini terdiri atas preparasi contoh, yaitu ekstraksi bungkil biji jarak dengan cara maserasi, analisis proksimat ampas bungkil biji jarak, detoksifikasi ampas bungkil biji jarak, analisis proksimat bungkil biji jarak setelah detoksifikasi, uji fitokimia dan pengujian toksisitas akut dari ampas setelah detoksifikasi terhadap tikus putih.

Pemilihan metode ekstraksi terhadap bungkil adalah dengan cara maserasi. Hal itu didasarkan karena metode ini memiliki keuntungan dalam segi penanganan yang lebih mudah dan biaya yang lebih murah dibandingkan dengan metode ekstraksi lain. Adapun tujuan ekstraksi adalah untuk menghilangkan minyak dan menghilangkan racun nonpolar.

1. Alur proses

Tahapan penelitian ini dilakukan mengikuti alur proses seperti tertera pada Gambar 1 yaitu ekstraksi bungkil biji jarak dengan proses maserasi, kemudian ekstrak dilakukan uji proksimat, fitokimia dan selanjutnya dilakukan proses detoksifikasi.

Proses detoksifikasi dilakukan dengan penambahan air ke dalam bungkil sebanyak 2 kali volume bungkil, kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 30 menit. Setelah itu ditempatkan dalam pendingin dan diliofilisasi (dikeringkan dan dibekukan), kemudian digerus, dicuci dengan metanol 92% sebanyak 4 kali. Setelah selesai proses

detoksifikasi selanjutnya dilakukan kembali uji proksimat, fitokimia dan uji toksisitas. Sampai tahap ini bungkil siap untuk diberikan sebagai pakan kepada tikus uji coba.

Jumlah tikus uji coba yang diberi pakan bungkil hasil detoksifikasi adalah 24 ekor tikus putih. Bungkil biji jarak diberikan secara oral (*cekok*) dengan variasi konsentrasi 0,40 mg/kg, 400 mg/kg, 4 g/kg, 10 g/kg dan 20 g/kg bobot badan tikus. Untuk setiap kelompok dosis digunakan 4 ekor tikus. Sebelum diberi pakan dalam konsentrasi sesuai perlakuan, keseluruhan tikus diberi pakan dasar yang bobotnya sama selama 1 minggu. Selanjutnya diberikan pakan sesuai dosis perlakuan dan dilihat tingkat kematiannya pada 24 jam pertama, dilanjutkan sampai 7 hari. Setiap hari diamati gejala klinisnya seperti nafsu makan, bobot badan, keadaan mata dan bulu dan tingkah laku. Penentuan LD50 dilakukan dengan analisis probit.

Gambar 1. Ekstraksi bungkil biji jarak dengan cara maserasi
 Figure 1. Extraction of *Jatropha curcas cake* through maceration

2. Ekstraksi minyak dari bungkil biji jarak

Sebanyak 500 g bungkil biji jarak dimasukkan ke dalam gelas piala dan ditambahkan petroleum eter sebanyak 750 ml. Gelas piala ditutup, isi dikocok beberapa menit dan dibiarkan sampai terjadi pemisahan antara endapan dengan ekstrak pelarutnya, kemudian larutan disaring. Ampasnya diberi pelarut lagi dan tahapan selanjutnya sama. Pengulangan dilakukan sampai ekstrak yang dihasilkan menjadi bening. Filtrat dari semua ulangan digabungkan, lalu ampas dikeringkan.

3. Analisis proksimat

a. Preparasi contoh

Ampas bungkil biji jarak dihaluskan dengan *blender* sehingga membentuk serbuk. Serbuk ini digunakan untuk analisis proksimat meliputi penentuan kadar air, kadar abu, kadar lemak, kadar protein, kadar serat kasar dan kadar gula pereduksi.

b. Penentuan kadar air (AOAC, 1999)

Sebanyak 5 g contoh yang telah dihaluskan, ditimbang dan dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 48 jam. Contoh diangkat dari oven dan didinginkan di dalam eksikator dan ditimbang. Prosedur diulang hingga kehilangan bobot selama pemanasan 3 jam tidak lebih dari 0,05%. Kadar air bungkil jarak pagar dihitung.

c. Penentuan kadar abu (AOAC, 1999)

Cawan porselin yang kosong dimasukkan ke dalam tanur 600°C selama 30 menit. Cawan dikeluarkan dan didinginkan dalam eksikator lalu ditimbang. Sebanyak 2 g contoh dimasukkan ke dalam cawan porselin dan dipanaskan diatas pembakar gas sampai tidak berasa lagi. Pemanasan dilanjutkan di dalam oven 600°C selama 6 jam (sampai tidak berjelaga), lalu dikeluarkan, didinginkan dalam eksikator dan ditimbang sampai diperoleh bobot tetap.

d. Penetapan nitrogen (AOAC, 1999)

Penentuan nitrogen dilakukan dengan metode Kjeldahl terhadap ampas bungkil jarak pagar untuk menentukan % N total. Sebanyak 0,5 g bungkil biji jarak ditimbang dalam labu destruksi, kemudian ditambahkan 12 ml H₂SO₄ pekat dan 1 butir tablet selenium. Larutan ini didestruksi selama 45 menit sampai diperoleh larutan berwarna hijau jernih. Larutan ini ditempatkan pada alat destilasi *Kjeltech*, kemudian didestilasi uap. Uapnya ditampung di dalam erlenmeyer yang berisi asam borat 4% dan indikator BCG-MM. Destilat yang diperoleh dititrasi dengan HCl 0,02 N. Titik akhir titrasi ditandai dengan terjadinya perubahan warna biru menjadi merah muda. Dilakukan juga dilakukan penetapan blanko.

$$\text{Kadar nitrogen (\%)} = \frac{(A - B) \times 14,007 \times N_{HCl}}{\text{bobot contoh (mg)}}$$

dimana : A = volume HCl untuk titrasi contoh (ml)

B = volume HCl untuk titrasi blanko (ml)

e. Penetapan kadar lemak (AOAC, 1999)

Labu lemak yang bersih ditambahkan beberapa batu didih lalu ditimbang bobot kosongnya. Labu lemak ini diisi dengan 50 ml pelarut petroleum eter. Sebanyak 3 g bungkil dibungkus dengan kertas saring yang dibuat seperti selongsong, lalu ditempatkan dalam alat *soxlet* yang disambungkan dengan alat refluks dan labu lemak. Ekstraksi dilakukan selama kurang lebih 6 jam. Larutan lemak dalam pelarut disulingkan, sehingga diperoleh kembali pelarut yang semula dipakai dalam alat *soxlet* dan lemak dalam labu lemak. Labu lemak kemudian dikeringkan pada oven 60°C dan ditimbang sampai diperoleh bobot konstan.

$$\text{Kadar lemak} = \frac{\text{bobot lemak (g)}}{\text{bobot contoh (g)}} \times 100\%$$

f. Penetapan kadar serat kasar (AOAC, 1999)

Sebanyak 5 g bungkil dimasukkan dalam labu *erlenmeyer* 500 ml, ditambahkan 50 ml H_2SO_4 1,25% dan diekstraksi dengan pendingin tegak selama 30 menit. Selanjutnya ditambahkan 50 ml NaOH 3,25% dan pemanasan dilanjutkan kembali selama 30 menit. Larutan disaring panas-panas dengan kertas saring *Whatman* 41 yang telah diketahui bobotnya. Wadah dicuci dengan air panas yang mengandung H_2SO_4 1,25%. Endapan yang diperoleh dicuci dengan alkohol 96%, kemudian dikeringkan dalam oven 105°C, didinginkan dan ditimbang sampai diperoleh bobot tetap.

$$\text{Kadar serat kasar} = \frac{\text{bobot serat}}{\text{bobot contoh}} \times 100\%$$

g. Penentuan karbohidrat dengan metode selisih (*by difference*)

$$\text{Kadar karbohidrat \% (b/b)} = 100\% - \{ \text{kadar air \% (b/b)} + \text{kadar lemak \% (b/b)} + \text{kadar abu \% (b/b)} + \text{kadar protein \% (b/b)} + \text{kadar serat kasar \% (b/b)} \}$$

h. Penentuan kadar gula pereduksi (Metode *Luff-Schoorl*).

Ekstraksi gula pereduksi dilakukan dengan menimbang sebanyak 10 g bungkil diekstraksi dengan 75 ml etanol 70% dalam labu *erlenmeyer* asah yang disambungkan dengan alat refluks. Ekstraksi dilakukan selama 1 jam. Larutan disaring dan ditera dalam labu takar 100 ml dengan etanol 70%.

Penentuan kadar gula pereduksi : Sebanyak 10 ml ekstrak gula pereduksi ditambah dengan 25 ml larutan *Luff-Schoorl* dimasukkan ke dalam labu *erlenmeyer* 100 ml, selanjutnya dipanaskan hingga larutan mendidih dan dibiarkan selama kurang lebih 10 menit. Setelah dingin, ditambahkan dengan 10 ml KI 20% dan 25 mL H_2SO_4 25% dan segera dititrasi dengan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N yang ditandai dengan perubahan warna menjadi kuning muda, lalu ditambahkan 3 tetes indikator pati dan titrasi dilanjutkan sampai titik akhir yang ditandai

dengan perubahan warna dari biru kehitaman menjadi tidak berwarna. Prosedur ini dilakukan juga terhadap blanko.

$$\text{Kadar gula pereduksi} = \frac{(V_b - V_c) \times N \text{ tiosulfat} \times BE_{\text{glukosa}} \times fp}{\text{bobot contoh}} \times 100\%$$

di mana : V_b = volume $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ untuk titrasi blanko (ml)

V_c = volume $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ untuk titrasi contoh (ml)

4. Detoksifikasi ampas bungkil biji jarak (Aregheore *et al.*, 2003)

Sebanyak 300 g ampas bungkil biji jarak ditimbang dan dimasukkan ke dalam gelas piala 1 liter dan ditambahkan air destilata sebanyak 600 ml. Campuran dibuat menjadi pasta ke dalam erlenmeyer yang ditutupi dengan alumunium foil dan dipanaskan dalam autoklaf pada 121°C selama 30 menit, tujuannya adalah untuk sterilisasi contoh dan mendetoksifikasi lektin (kursin) dan inhibitor tripsin yang seperti dikatakan sebelumnya merupakan racun dalam jarak pagar. Hal ini dikarenakan pemanasan dengan autoklaf pada suhu tersebut dapat menonaktifkan lektin dan inhibitor tripsin. (Aregheore *et al.*, 2003). Contoh yang telah diautoklaf, dipindahkan dan didinginkan dalam suhu kamar. Setelah itu ditempatkan dalam pendingin dan diliofilisasi pada hari berikutnya, kemudian digerus. Contoh yang diliofilisasi dibilas dengan metanol 92% sebanyak 4 kali.

5. Analisis fitokimia (Harborne, 1986)

a. Uji flavonoid

Sebanyak 0,1 g contoh dimasukkan ke dalam 100 ml air panas, kemudian dididihkan selama 5 menit. Sebanyak 5 ml filtratnya dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 0,1 mg Mg, 1 ml HCl pekat dan 1 ml amil alkohol, kemudian dikocok. Terbentuknya warna kuning sampai merah menandakan adanya flavonoid.

b. Uji alkaloid

Sebanyak 0,3 g contoh dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 ml kloroform-amonia dan beberapa tetes H_2SO_4 2 M, lalu dikocok perlahan sehingga terbentuk dua lapisan. Lapisan asam (lapisan tak berwarna) dipipet ke dalam tabung reaksi lain dan ditambahkan pereaksi Meyer. Reaksi positif ditandai dengan adanya kabut putih hingga gumpalan putih.

c. Uji tanin

Sebanyak 0,1 g contoh dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 ml metanol dan beberapa tetes FeCl_3 1%. Terjadinya warna biru, hijau atau ungu menunjukkan adanya tanin.

d. Uji saponin.

Sebanyak 1 g contoh dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 5 ml akuades, selanjutnya dididihkan selama 5 menit dan dikocok hingga berbusa. Adanya busa yang mantap selama 15 menit menunjukkan adanya saponin.

e. Uji steroid dan terpenoid.

Sebanyak 1 g contoh diekstrak dengan 12,5 ml etanol panas, kemudian ekstrak dikeringkan di dalam pinggan porselin. Residu yang diperoleh dilarutkan dalam eter. Ekstrak yang larut dalam eter diuji dengan pereaksi *Lieberman-Buchard*. Residu yang diperoleh dilarutkan kembali dalam eter dan diuji dengan pereaksi *Lieberman-Buchard*. Terbentuknya warna biru atau hijau menunjukkan adanya steroid dan warna merah atau ungu menunjukkan adanya terpenoid.

f. Uji glikogen sianogen.

Keberadaan glikosida sianogen dalam tumbuhan dideteksi dengan kertas pikrat. Kertas pikrat dibuat dengan mencelupkan kertas saring ke dalam larutan jenuh asam pikrat (2,4,6-trinitrofenol) yang telah dinetralkan dengan NaHCO_3 . Ekstrak ditempatkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan satu tetes air dan dua tetes toluena. Suspensi kertas pikrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian tabung ditutup dan diinkubasi pada suhu 40°C selama 2 jam. Perubahan warna kuning menjadi coklat merah menunjukkan adanya HCN yang dibebaskan secara enzimatis.

6. Uji toksisitas akut

Untuk uji toksisitas akut digunakan 24 ekor tikus putih. Ampas bungkil biji jarak setelah detoksifikasi diberikan secara oral dengan variasi konsentrasi 0,40 mg/kg, 400 mg/kg, 4 g/kg, 10 g/kg dan 20 g/kg bobot badan tikus. Untuk setiap kelompok dosis digunakan 4 ekor tikus. Semua hewan pada tiap kelompok dilihat tingkat kematiannya pada 24 jam pertama, dilanjutkan sampai 7 hari. Setiap hari diamati gejala klinisnya seperti nafsu makan, bobot badan, keadaan mata dan bulu serta tingkah laku. Penentuan LD50 dilakukan dengan analisis probit.

7. Rancangan percobaan

Pengolahan data dilakukan menggunakan uji F (uji beda) nilai sebelum dan setelah detoksifikasi untuk data kadar air, abu, lemak, protein, serat kasar dan gula pereduksi. Di mana : H_0 = nilai sebelum detoksifikasi dan setelah detoksifikasi sama dan H_1 = nilai sebelum detoksifikasi dan setelah detoksifikasi berbeda.

Jika $F_{hitung} > F_{tabel}$ = maka H_0 ditolak

Jika $F_{hitung} < F_{tabel}$ = maka H_0 diterima

Tabel 1. Kandungan proksimat (%) contoh berdasarkan bobot basah
Table 1. Proximate analyses (%) of samples in wet basis

Parameter (Parameters)	Sebelum detoksifikasi (Before detoxification)	Setelah detoksifikasi (After detoxification)
Kadar air (<i>Moisture</i>), %	4,97 ± 0,48	5,20 ± 0,10
Kadar abu (<i>Ash</i>), %*)	9,28 ± 0,01	9,84 ± 0,02
Kadar lemak (<i>Fat</i>), %*)	7,86 ± 0,54	2,34 ± 0,31
Kadar protein (<i>Protein</i>), %	46,36 ± 0,73	46,83 ± 0,79
Kadar serat kasar (<i>Crude fiber</i>), %	20,06 ± 3,88	20,04 ± 1,19
Kadar gula (<i>Sugar</i>), %*)	3,74 ± 0,13	5,87 ± 0,06
Kadar karbohidrat (<i>Carbohydrate</i>), %*)	7,73 ± 0,00	9,88 ± 0,00

Keterangan (*Remarks*): * = Menunjukkan perbedaan nyata antara sebelum dan sesudah detoksifikasi (*Shows significance difference value between before and after detoxification*)

Berdasarkan Tabel 1, detoksifikasi dapat mempengaruhi beberapa parameter analisis proksimat, sedangkan parameter lainnya tidak dipengaruhi oleh detoksifikasi. Parameter yang berubah karena detoksifikasi adalah kadar abu, kadar lemak, kadar gula pereduksi dan kadar karbohidrat. Hasil pengukuran menunjukkan bahwa kadar abu sebelum dan setelah detoksifikasi berturut-turut sebesar 9,28% (b/b) dan 9,84% (b/b). Berdasarkan analisis statistika dengan menggunakan uji keragaman (ANOVA satu arah), kadar abu bungkil sebelum dan setelah detoksifikasi berbeda nyata. Hal ini diduga karena faktor pelarut yaitu akuades yang digunakan ketika detoksifikasi diduga mengandung mineral yang menyebabkan kadar abu bertambah. Mineral yang diperlukan untuk makanan ternak adalah Ca, P, Mg, Mn, Co, Fe, Cu, Na, Cl, K, I₂ dan F.

Parameter lain yang berubah karena detoksifikasi adalah kadar lemak. Hasil penetapan menunjukkan bahwa kadar lemak contoh sebelum detoksifikasi sebesar 7,86% (b/b), sedangkan kadar lemak contoh setelah detoksifikasi sebesar 2,34% (b/b). Berdasarkan analisis statistika dengan menggunakan uji keragaman (ANOVA satu arah), kadar lemak contoh sebelum dan setelah detoksifikasi berbeda nyata. Turunnya kadar lemak contoh sebelum dan setelah detoksifikasi diduga karena proses detoksifikasi yang menyebabkan terjadinya hidrolisis lemak menjadi asam lemak bebas, selain itu juga pada waktu pemanasan dengan *autoclave* pada suhu 121°C menyebabkan menguapnya asam lemak yang titik didihnya berada di bawah suhu tersebut. Lama penyimpanan bungkil sebelum analisis kimia, kemungkinan berpengaruh terhadap munculnya mikroorganisme yang dapat mendegradasi asam lemak. Mikroorganisme menghidrolisis trigliserida secara enzimatis kemudian mendegradasi asam lemak bebas dengan jalur β -oksidasi membentuk metil keton (Belitz & Grosch, 1999).

Kadar gula pereduksi merupakan salah satu parameter yang berubah karena detoksifikasi. Berdasarkan hasil pengukuran diperoleh kadar gula pereduksi contoh sebelum detoksifikasi sebesar 3,74% (b/b), sedangkan kadar gula pereduksi setelah detoksifikasi sebesar 5,87% (b/b). Analisis statistika menggunakan uji keragaman (ANOVA satu arah) menunjukkan bahwa kadar gula pereduksi contoh sebelum dan setelah detoksifikasi berbeda nyata. Kenaikan kadar gula pereduksi ini ketika detoksifikasi dilakukan menyebabkan terjadinya hidrolisis sebagian yang mengakibatkan terdegradasinya selulosa (bukan gula pereduksi) menjadi selobiosa (gula pereduksi) sehingga terjadi kenaikan kadar gula pereduksi (Fessenden & Fessenden, 1986).

Karbohidrat diperoleh dengan menggunakan metode selisih (*by difference*). Kadar karbohidrat contoh sebelum detoksifikasi diperoleh sebesar 7,73% (b/b). Nilai ini lebih rendah dibanding dengan contoh setelah detoksifikasi yaitu sebesar 9,88% (b/b). Hal ini dikarenakan dari hasil analisis proksimat, kadar lemak contoh setelah detoksifikasi memiliki kadar yang jauh lebih rendah dibandingkan dengan contoh sebelum detoksifikasi (Tabel 1), sehingga berpengaruh pada kadar karbohidrat contoh.

Parameter analisis proksimat yang tidak mengalami perubahan akibat detoksifikasi meliputi kadar air, kadar protein dan serat kasar. Hal ini didasarkan pada analisis statistika menggunakan uji keragaman (ANOVA satu arah) seperti terlihat pada lampiran.

Kadar proksimat contoh hasil analisis dibandingkan dengan standar proksimat beberapa hewan ternak (Tabel 2). Perbandingan kadar proksimat contoh dengan standar kadar proksimat pakan ternak (ikan sidat, ayam petelur, puyuh petelur pemula, dan sapi perah dara) menunjukkan bahwa contoh berada pada kisaran standar pakan untuk sapi perah dara. Kadar serat kasar bungkil jarak pagar lebih tinggi daripada kadar serat standar pakan sapi perah dara. Namun dengan kadar serat tersebut, ampas bungkil biji jarak pagar masih cocok digunakan untuk pakan ruminansia seperti kambing, sapi dan kerbau (Makkar & Becker, 1999). Hal ini dikarenakan ruminansia memiliki bakteri rumen yang menghasilkan enzim selulase sehingga selulosa (serat) dapat dicerna. Semakin tinggi kadar serat kasar, maka mutu pakan semakin rendah karena pakan akan semakin sulit untuk dicerna dan tidak dapat memberikan zat-zat nutrisi yang berimbang untuk mendukung produktivitas yang optimal. Makanan dengan kandungan serat kasar yang tinggi juga dilaporkan dapat mengurangi bobot badan (Bell *et al.*, 1990, diacu dalam Joseph, 2002). Serat makanan akan tinggal dalam saluran pencernaan dalam waktu relatif singkat, sehingga absorpsi zat makanan berkurang. Selain itu makanan yang mengandung serat yang relatif tinggi akan memberikan rasa kenyang, sehingga menghentikan nafsu makan dan berakibat pada turunnya konsumsi makanan.

C. Analisis Fitokimia

Analisis fitokimia dilakukan sebagai uji tambahan terhadap detoksifikasi yang dilakukan. Bungkil biji jarak sebelum dan setelah detoksifikasi dianalisis kandungan senyawa aktifnya. Hasil dari analisis fitokimia menunjukkan bahwa bungkil biji jarak sebelum dan setelah detoksifikasi mengandung alkaloid, saponin dan triterpenoid. Tetapi kandungan senyawa aktif dalam bungkil memiliki kadar yang berbeda kecuali untuk triterpenoid. Detoksifikasi yang dilakukan dapat mengurangi kadar saponin dan alkaloid dalam bungkil biji jarak. Berkurangnya saponin dan alkaloid dalam contoh diduga karena

detoksifikasi. Pembilasan dengan metanol menyebabkan ikut terbuangnya saponin dan alkaloid bersama metanol.

Menurut Sinaga (2005), jarak pagar mengandung HCN yang bersifat racun. Uji glikogen sianogen merupakan suatu uji untuk mendeteksi keberadaan HCN. Senyawaan glikosida sianogen menghasilkan HCN jika terhidrolisis. Keberadaan HCN tidak terdeteksi dalam sampel, diduga HCN yang terdapat dalam bungkil telah terhidrolisis dan teruapkan karena pemanasan saat pengeringan. Titik didih HCN sebesar 26°C (Weast, 1981), sehingga dengan pengeringan menggunakan oven pada suhu 40-50°C kemungkinan teruapkan sangat besar. Adapun reaksi hidrolisis senyawaan glikosida sianogen sebagai berikut :

Tabel 2. Perbandingan nutrisi bungkil biji jarak pagar dengan standar pakan untuk beberapa hewan ternak

Table 2. Nutrition comparison between *jatropha* seed cake with some animals feed

Parameter (Treatments) % (b/b)	Ikan sidat (<i>Sidat fish</i>) SNI 01 - 3906 -1995	Ayam petelur (<i>Egg chicken</i>) : SNI 01 -3929 - 1995	Puyuh petelur (<i>Egg -puyuh</i>) : SNI 01-3906 - 1995	Sapi perah (<i>Milk-sheep</i>) : SNI 01 -3148 - 1992	Bungkil jarak setelah detok - sifikasi (<i>Jatro- pha seed after detoxification</i>)
Air (<i>Moisture</i>)	Maks. 10	Maks. 14	Maks. 14	Maks. 14	5,21
Abu (<i>Ash</i>)	Maks. 11	10 – 14	Maks. 8	-	9,84
Lemak (<i>Fat</i>)	Min. 7	2,5 – 7	Min. 2,8	Maks. 7	2,34
Protein (<i>Protein</i>)	Min. 40	13,5	Min. 20	Min. 16	46,72
Serat (<i>Fiber</i>)	Maks. 2	Maks. 7	Maks. 5	Maks. 18	20,24

Tabel 3. Hasil analisis fitokimia ampas bungkil biji jarak sebelum dan setelah detoksifikasi

Table 3. Phytochemistry analyses results of *jatropha* seed cake before and after detoxification

Analisis (<i>Analyses</i>)	Sebelum detoksifikasi (<i>Before detoxification</i>)	Setelah detoksifikasi (<i>After detoxification</i>)
Flavonoid	-	-
Fenolik hidrokuinon (<i>Phenolic hydroquinon</i>)	-	-
Alkaloid (<i>Alkaloid</i>)	+++	+
Tanin	-	-
Saponin	+++++	++
Steroid	-	-
Triterpenoid	+	+
Glikogen sianogen (<i>Glycogen cyanogen</i>)	-	-

Keterangan (*Remarks*): - = Tidak ada kandungan zat tersebut (*Substance not present*)

+ = Ada kandungan zat tersebut (*Substance is present*)

Menunjukkan jumlah secara kuantitatif (*Shows quantitatively total numbers*)

D. Toksisitas1. Keadaan Fisik Hewan Coba

1. Bobot badan (BB)

Bobot badan hewan percobaan mengalami kenaikan baik untuk kontrol normal maupun kelompok perlakuan (Tabel 4). Untuk kelompok hewan percobaan dengan dosis 40 mg/kg BB sampai dosis tertinggi (20 g/kg BB), terjadi penurunan bobot badan selama dua hari setelah pencekohan. Tetapi setelah itu, bobot badan cenderung meningkat. Penurunan ini diduga karena hewan coba stres akibat pencekohan atau banyaknya contoh yang diberikan melebihi kapasitas perut hewan coba.

Tabel 4. Rata-rata bobot badan tikus-coba sebelum dan setelah perlakuan
Table 4. Weight means of test-rat before and after treatments

Perlakuan (<i>Treatments</i>)	Sebelum perlakuan (<i>Before treatments</i>)	Setelah perlakuan (<i>After treatments</i>)	Kenaikan bobot badan (<i>Increasing body weight</i>)
Kontrol (<i>Control</i>)	100,00	128,75	28,75
Dosis 4 mg/kg BB	146,25	177,5 0	21,37
Dosis 40 mg/kg BB	161,25	167,5 0	3,88
Dosis 400 mg/kg BB	157,5 0	171,25	8,73
Dosis 1000 g/kg BB	157,5 0	172,5 0	9,52
Dosis 2000 g/kg BB	160,00	173,75	8.59

Kenaikan bobot badan hewan coba kelompok normal dan dosis 4 mg/kg BB lebih tinggi daripada kenaikan bobot badan hewan coba kelompok dosis lain di atas 40 mg/kg BB. Hal ini diduga karena pemberian dosis di atas 40 mg/kg BB dikatakan cukup banyak, sehingga pencekohan dilakukan berkali-kali yang menyebabkan hewan coba stres dan mengalami penurunan nafsu makan. Hal ini menyebabkan kenaikan bobot badan cenderung konstan. Perbedaan kenaikan bobot badan hewan coba pada kelompok perlakuan di atas 40 mg/kg BB dikarenakan hewan coba berada dalam masa pertumbuhan. Pertumbuhan hewan coba yang satu dengan yang lainnya berbeda karena setiap hewan coba memiliki sistem metabolisme dan pertumbuhan yang berbeda.

2. Gejala klinis

Selain pengamatan bobot badan, dilakukan pula pengamatan gejala klinis hewan percobaan selama adaptasi dan setelah perlakuan seperti nafsu makan, keadaan mata dan bulu serta tingkah laku. Berdasarkan hasil pengamatan, nafsu makan pada semua hewan

berbanding lurus dengan bobot badan. Nafsu makan hewan percobaan selama adaptasi dan setelah perlakuan mengalami perubahan untuk kontrol dan dosis 4 mg/kg BB. Hal ini sebanding dengan perubahan bobot badan hewan percobaan, sedang untuk dosis lain diatas 4 mg/kg BB tidak mengalami perubahan yang berarti baik dari nafsu makan maupun bobot badan. Adapun keadaan mata dan bulu semua hewan percobaan menunjukkan keadaan normal. Berbeda halnya dengan tingkah laku. Sehari setelah pencekokan, tingkah laku hewan percobaan yang dicekok sampel dengan dosis 40 mg/kg BB, 400 mg/kg BB, 10 g/kg BB dan 20 g/kg BB cenderung tidak aktif. Hal ini diduga karena hewan percobaan stres akibat pencekokan atau banyaknya contoh yang diberikan melebihi kapasitas perut tikus.

3. Penentuan toksisitas akut (LD50)

Secara keseluruhan, hewan coba yang dicekok dengan contoh setelah detoksifikasi selama perlakuan baik setelah 24 jam pertama maupun 7 hari berikutnya tidak menunjukkan adanya kematian. Oleh karena itu, LD50 tidak dapat ditentukan. Tidak adanya kematian sampai hari ke-7 pada kelompok hewan yang diberi dosis tertinggi, menyebabkan percobaan tidak dilanjutkan sampai penentuan LD50 yang pasti. Percobaan tidak dilanjutkan dengan meningkatkan dosis lebih dari 20 g/kg BB, karena tidak mungkin diberikan secara oral pada tikus.

Pemberian dosis sebesar 20 g/kg BB tidak menyebabkan kematian, sehingga dapat dikatakan bahwa ampas bungkil setelah detoksifikasi yang diberikan kepada tikus tidak berbahaya. Keadaan seperti ini sesuai dengan pernyataan Lu (1995), yaitu dalam beberapa hal khususnya apabila toksisitas akutnya rendah terkadang tidak perlu untuk menentukan LD50 secara tepat. Suatu angka perkiraan sudah dapat memberikan manfaat. Informasi bahwa dosis yang cukup besar saja menyebabkan hanya sedikit kematian atau bahkan tidak menyebabkan kematian sudah cukup (EPA, 1988, diacu dalam Lu, 1995). Apabila sejumlah zat diberikan kepada hewan dengan dosis tinggi dan tidak ada hewan yang mati, dianggap bahwa semua toksisitas akut yang berbahaya dapat disingkirkan dan LD50 tidak perlu ditentukan. Prinsip ini telah diterapkan dan diterima oleh FAO/WHO *Expert Committee on Food Additives* (Lu, 1995). Ampas bungkil biji jarak pagar setelah detoksifikasi yang diberikan dengan berbagai dosis tidak menimbulkan kematian pada hewan percobaan, maka diperkirakan bungkil ini memiliki LD50 di atas dosis 15 g/kg BB. Berdasarkan klasifikasi toksisitas, maka nilai tersebut termasuk kategori nontoksik.

IV. KESIMPULAN DAN SARAN

1. Detoksifikasi berpengaruh terhadap kadar abu, lemak, karbohidrat dan kadar gula pereduksi contoh, sedangkan kadar air, protein dan serat kasar contoh tidak mengalami perubahan secara nyata.
2. Berdasarkan analisis proksimat yang dilakukan, ampas bungkil biji jarak mendekati nilai kadar standar proksimat untuk pakan ruminansia.
3. Analisis tambahan terhadap detoksifikasi yang dilakukan adalah analisis fitokimia,

- menunjukkan bahwa detoksifikasi dapat mengurangi kadar saponin dan alkaloid contoh.
4. Uji toksisitas menyatakan bahwa ampas bungkil biji jarak setelah diberi perlakuan detoksifikasi, maka bungkil tersebut menjadi tidak toksik.
 5. Perlu penelitian toksisitas lebih lanjut dengan jangka waktu dan pemakaian yang lebih lama seperti toksisitas kronik atau subkronik dengan menggunakan hewan percobaan dari spesies yang sama disertai dengan analisis histopatologi organ.
 6. Perlu adanya analisis kualitatif maupun kuantitatif terhadap racun-racun yang diduga berperan dalam toksisitas biji jarak seperti ester forbol dan juga racun-racun lainnya.

V. DAFTAR PUSTAKA

- AOAC. Association of Official Analytical Chemist. 1999. Official methods of analysis of AOAC International. Ed. ke-8. AOAC International. Maryland.
- Aregheore, E.M., Becker, K., and Makkar, H.P.S. 2003. Detoxification of toxic variety of *Jatropha curcas* using heat and chemical treatment, and preliminary nutritional evaluation with rats. *S. Pac. J. Nat. Sci.* 21 : 50 - 56.
- Arif, Z. 2006. Identifikasi fraksi daging buah picung (*Pangium edule* Reinw.) yang aktif sebagai insektisida botani terhadap ulat grayak (*Spodoptera litura* F (Lepidoptera: Noctuidae)). Skripsi : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, IPB. Bogor.
- Badan Standardisasi Nasional. 1992. SNI 01-3148-1992 : Ransum Sapi Perah. BSN. Jakarta.
- _____. 1995. SNI 01-3906-1995 : Ransum Puyuh Petelur Dara. BSN. Jakarta.
- _____. 1995. SNI 01-3929-1995 : Ayam Petelur. BSN. Jakarta.
- Becker, K., and Makkar, H.P.S. 1998. Effects of Phorbol Esters in Carp (*Cyprinus carpio* L). *Vet Human Toxicol*, 40 (2) : 82 - 86.
- Belitz, H.D., and Grosch, W. 1999. Food Chemistry. Springer. Heidelberg - Berlin.
- Endra, Y. 2006. Analisis Proksimat dan Komposisi Asam Amino Buah Pisang Batu (*Musa balbisiana* Colla). Skripsi : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, IPB. Bogor.
- Fessenden, R.J., and Fessenden, J.S. 1986. Kimia Organik. Jilid ke-2. Edisi ke-3. Pudjaatmaka, A.H., penerjemah ; Terjemahan dari : Organic Chemistry, Third Edition. Erlangga. Jakarta.
- Harborne, J.B. 1987. Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan. Padmawinata, K. & Sudiro, I., penerjemah ; Terjemahan dari : Phytochemical Methods. ITB. Bandung.
- Heyne, K. 1987. Tumbuhan Berguna Indonesia. Terjemahan Badan Litbang Kehutanan. Yayasan Sarana Wana Jaya. Jakarta.

- Joseph, G. 2002. Manfaat serat makanan bagi kesehatan kita. Makalah Falsafah Sains. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Kulkarni, M.L., Sreekar, H., Keshavamurthy, K.S., and Shenoy, N. 2005. *Jatropha curcas* - Poisoning. *Indian J Pediatr.* 72 : 75 - 76. [Terhubung berkala] <http://www.ijp.pediatricsindia.org/article.asp>. [11 Februari 2006].
- Lu, F.C. 1995. Toksikologi Dasar : Asas, Organ Sasaran dan Penilaian Resiko. Nugroho, E., penerjemah ; Terjemahan dari : Basic Toxicology: fundamentals, target organs, and risk assesment. UI Pr. Jakarta.
- Makkar, H.P.S., Becker, K., Sporer, F., and Wink, M. 1997. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. *J. Agric. Food Chem.*, 45 : 3152 - 3157.
- Makkar, H.P.S., and Becker, K. 1999. Plant toxins and detoxification methods to improve feed quality of tropical seed. *Asian-Australian Journal of Animal Sciences*, 12 : 467 - 480.
- Sinaga, E. 2005. *Jatropha curcas* L. jarak pagar. 4 : 3. [Terhubung berkala]. http://www.apjii.or.id/artikel/ttg_tanamanobat/unas/jarakpagar.pdf. [18 Januari 2006].
- Sudradjat, R. 2006. Memproduksi Biodiesel dari Jarak Pagar. Seri Argitekno. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Weast, R.C. 1981. Handbook of Chemistry and Physics. 61st Ed. 1980 - 1981. CRC Pr. Boca Raton.

Lampiran 1. Data analisis varian dari kadar proksimat contoh
Appendix 1. Data of variance analysis of proximate content

Proksimat (<i>Proximate</i>)	Jumlah kuadrat (<i>SS</i>)	dB (<i>df</i>)	Rata-rata kuadrat (<i>MS</i>)	F-hitung (<i>F.calc.</i>)	F-tabel (<i>F.tab.</i>)
Air (<i>Moisture</i>)	0,079	1	0,079	0,658	7,71
Abu (<i>Ash</i>)	0,470	1	0,470	1411,200	7,71
Lemak (<i>Fat</i>)	30,526	1	30,526	155,248	18,51
Protein (<i>Protein</i>)	0,216	1	0,216	0,374	18,51
Serat (<i>Fiber</i>)	0,000	1	0,000	0,000	7,71
Gula Pereduksi (<i>Reduction sugar</i>)	6,827	1	6,827	681,531	7,71

Hipotesis (*Hypothesis*) :

Ho : diduga bahwa nilai dari kedua contoh adalah sama
 (*assumed that those two values are same*)

Hi : diduga bahwa nilai dari kedua contoh adalah berbeda
 (*assumed that those two values are different*)

Pengujian hipotesis (*Hypothesis analysis*) :

Jika (*If*)

F-hitung > F-tabel, maka Ho ditolak (*F.calc > F.tab, Ho refused*)

F-hitung < F-tabel, maka Ho diterima (*F.calc < F.tab, Ho accepted*)

Lampiran (Appendix) 2. Data bobot badan tikus selama adaptasi dan setelah perlakuan (*Weight of test-rat before and after treatments*)

Dosis (Dosis)	Tikus (Rat)	-7	-6	-5	-4	-3	-2	Bobot badan (<i>Body weight</i>) (gram), Hari (<i>Day</i>) ke-10		1	2	3	4	5	6	7
Kontrol (Control)	1	100	100	105	110	110	110	110	110	115	115	120	130	130	135	145
	2	110	110	110	110	110	110	110	110	110	115	115	115	120	125	125
	3	80	80	80	85	85	85	85	85	95	95	100	100	115	115	115
Rata2 (<i>Mean</i>):	4	90	90	90	95	95	95	95	95	110	110	115	115	125	130	130
		95	95	96,25	100	100	100	100	100	107,5	108,75	112,5	115	122,5	126,25	128,75
	1	140	140	145	150	150	150	150	150	150	165	165	170	170	175	175
4 mg/kg BB	2	125	125	125	125	130	130	130	130	135	140	145	155	160	160	170
	3	165	165	165	170	170	170	170	170	175	180	175	185	190	190	190
	4	135	135	135	135	135	135	135	135	140	155	150	160	165	170	175
Rata2 (<i>Mean</i>):		141,25	141,25	142,5	145	146,25	146,25	146,25	146,25	150	160	158,75	167,5	171,25	173,75	177,5
	1	135	135	140	140	140	140	140	145	135	130	135	135	135	135	150
	2	155	160	160	160	160	160	160	160	170	175	180	180	190	195	195
40 mg/kg BB	3	110	115	115	120	120	120	120	120	115	115	130	130	135	135	140
	4	205	210	210	215	215	215	215	215	205	200	190	190	190	190	185
		151,25	155	156,25	158,75	158,75	158,75	158,75	161,25	156,25	155	158,75	158,75	162,5	163,75	167,5
40 mg/kg BB	1	135	135	135	135	135	135	135	135	145	150	155	160	160	160	170
	2	150	150	150	155	155	160	160	160	140	140	140	140	140	150	155
	3	100	110	110	115	115	115	115	120	120	120	130	130	135	140	140
Rata2 (<i>Mean</i>):	4	200	200	200	210	210	215	215	215	200	205	200	205	210	220	220
		146,25	148,75	148,75	153,75	153,75	156,25	156,25	157,5	151,25	153,75	156,25	158,75	161,25	167,5	171,25
	1	135	135	140	140	145	145	145	145	135	140	145	150	155	155	155
10 g/kg BB	2	165	165	165	165	165	165	165	165	170	170	175	185	185	185	195
	3	110	110	115	115	115	115	120	125	115	115	130	135	135	135	140
	4	180	180	180	180	180	180	180	190	180	175	185	185	185	190	200
Rata2 (<i>Mean</i>):		147,5	147,5	150	150	151,25	151,25	152,5	157,5	150	150	158,75	163,75	165	166,25	172,5
	1	130	135	135	140	140	140	140	145	140	140	150	155	165	165	170
	2	140	140	140	140	140	140	145	145	135	135	135	140	140	140	150
20 g/kg BB	3	155	155	155	155	155	155	155	160	160	165	170	170	165	175	175
	4	180	180	180	180	180	180	185	190	170	180	185	185	190	190	195
		151,25	152,5	152,5	153,75	153,75	153,75	156,25	160	151,25	155	160	162,5	165	167,5	173,75