

**DISERTASI**

**PENGEMBANGAN METODE ANALISIS SECARA  
FISIKOKIMIA DAN BIOLOGI MOLEKULER UNTUK  
DETEKSI BAKSO DAN SOSIS SAPI YANG MENGANDUNG  
DAGING TIKUS (*Rattus norvegicus*) UNTUK AUTENTIKASI  
HALAL**



Oleh  
**DWI LESTARI**  
**NIM. 2131012006**

Tim Promotor

**Prof. apt. Dachriyanus, Ph.D**  
**Prof. apt. Abdul Rohman, Ph.D**  
**Dr. apt. Syofyan, M.Farm.**

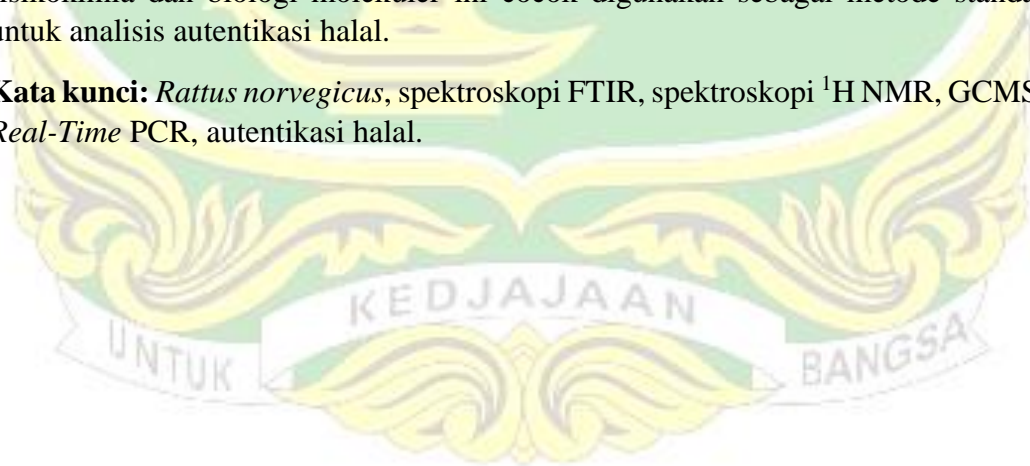
**PROGRAM STUDI FARMASI PROGRAM DOKTOR**  
**FAKULTAS FARMASI**  
**UNIVERSITAS ANDALAS**  
**PADANG**  
**2024**

## ABSTRAK

Kehalalan suatu produk pangan merupakan hal yang sangat penting bagi umat Islam. Produsen yang tidak beretika sering kali mencampurkan daging tidak halal yang lebih murah dengan daging halal yang harganya lebih tinggi. Mengidentifikasi daging dalam produk makanan penting untuk masalah halal dan haram serta pelanggaran etika secara umum. Oleh karena itu, metode analisis yang efektif untuk mendeteksi daging tidak halal dalam produk makanan olahan sangat diperlukan. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan pengembangan metode analisis secara fisikokimia dan biologi molekuler untuk mengidentifikasi keberadaan daging tikus dalam produk makanan olahan daging seperti bakso dan sosis sapi. Komponen lemak pada bakso dan sosis referensi yang mengandung daging sapi, daging tikus, atau campuran binernya diekstraksi menggunakan metode Bligh Dyer, Folch dan Soxhlet. Komponen lemak yang diekstraksi kemudian dianalisis menggunakan spektroskopi FTIR dan setiap sampel dipindai sebanyak tiga ulangan pada daerah bilangan gelombang 4000-650  $\text{cm}^{-1}$ . Analisis metabolomik menggunakan spektroskopi  $^1\text{H}$  NMR untuk mendeteksi keberadaan daging daging tikus pada sampel bakso dan sosis referensi. Hasil spektrum FTIR dan spektrum  $^1\text{H}$  NMR yang diperoleh digunakan sebagai variabel pada pemodelan kemometrika *supervised pattern recognition* dan kalibrasi multivariat. Analisis menggunakan GCMS dimulai dengan ekstraksi lemak dari daging mentah *Rattus norvegicus*, sapi, ayam, babi, dan anjing menggunakan metode Bligh Dyer, kemudian diderivatisasi sehingga diperoleh metil ester yang kemudian diinjeksikan ke dalam instrumen GCMS. Data GCMS kemudian diolah menggunakan kemometrika *unsupervised pattern recognition* untuk mengelompokkan lemak *Rattus norvegicus* dengan lemak hewani lainnya (sapi, ayam, babi, dan anjing). Analisis *Real-Time* PCR menggunakan primer spesifik spesies yang menargetkan NADH *dehydrogenase subunit 6* (ND6) untuk mengidentifikasi daging tikus. Ekstraksi DNA menggunakan FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit, dan DNA yang diekstraksi dilihat konsentrasi dan indeks kemurnian menggunakan NANO-Quant SPARK TECAN. Temperatur *annealing* ( $T_a$ ) yang digunakan untuk memberikan reaksi amplifikasi optimum, dan beberapa karakteristik kinerja dievaluasi untuk *Real Time* PCR, termasuk sensitivitas, efisiensi, dan keterulangan. Hasil rendemen lemak yang diperoleh dari bakso dan sosis referensi memberikan hasil bahwa pada ekstraksi Soxhlet memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan menggunakan metode Bligh Dyer maupun metode Folch. LDA berhasil mengelompokkan lemak dari bakso dan sosis (sapi, tikus dan campurannya) pada daerah bilangan gelombang 3100-800  $\text{cm}^{-1}$  untuk bakso dan pada daerah bilangan gelombang 3100-700  $\text{cm}^{-1}$  untuk sosis dengan tingkat akurasi 100% dan Kalibrasi multivariat *Partial Least Square* (PLS) dengan menggunakan kondisi optimal karena memberikan nilai  $R^2$  yang mendekati 1 dan nilai RMSEC serta RMSEP nya mendekati 0. Hasil spektra  $^1\text{H}$  NMR diperoleh metabolit asam amino (alanin, asam aspartat, kreatin, betain, glutamin, isoleusin, dan valin), dipeptida, asam butirat, asam organik (asetat, format dan piruvat), vitamin (biotin), gula (glukosa dan gliserol), nukleosida (inosin), metabolit terkait energi (laktat, karnitin dan

ADP/AMP/ATP), dan dimetiamin. Metabolit khas yang diperoleh pada tikus adalah asam butirat, dan metabolisme khas pada sapi adalah kolin, glukosa, glutamin, valin dan asam piruvat. Kombinasi dengan kemometrika PLS-DA menunjukkan model *goodness of fit* yang tinggi dan prediktabilitas yang cukup baik. Hasil analisis GCMS menunjukkan bahwa tikus (*Rattus norvegicus*) memiliki asam lemak jenuh dan tak jenuh. Asam lemak jenuh pada tikus (*Rattus norvegicus*) adalah asam laurat, asam miristat, asam palmitat, asam stearat, dan asam arakidat. Sedangkan asam lemak tak jenuh pada tikus (*Rattus norvegicus*) adalah asam palmitoleat, asam vaksinat, asam oleat, asam linoleat dan asam eukosatrienoat. Penggunaan *Principal Component Analysis* (PCA) berhasil dapat mengklasifikasikan lemak tikus (*Rattus norvegicus*) dan lemak hewani lainnya. Pada analisis *Real-Time* PCR diperoleh primer (*Forward*: CAAGTCTCCGGGTACTCCTC dan *Reverse*: GATTGTTAGTGGATGTATTGGGTGC ; *Product length*: 150 ; (ND6) Genbank MW209726.1 pada suhu *annealing* optimum 59,0°C dan Cq sebesar 16,848. Nilai efisiensi daging tikus mentah, bakso referensi dan sosis referensi memenuhi kriteria kurva linearitas yaitu 90-110%. Uji sensitivitas memperoleh nilai  $r^2$  mendekati 1 dan LOD untuk daging tikus mentah dan bakso referensi adalah 97,66 pg/ $\mu$ L sedangkan untuk sosis referensi diperoleh nilai LOD 48,83 pg/ $\mu$ L. Uji keterulangan memperoleh nilai CV <25% untuk daging tikus mentah, bakso referensi dan sosis referensi. Metode analisis secara fisikokimia (spektroskopi FTIR, spektroskopi  $^1\text{H}$  NMR dan GCMS) yang dikombinasikan dengan kemometrika menunjukkan bahwa metode tersebut efektif dan *reliable* untuk autentikasi daging tikus (*Rattus norvegicus*) dalam bakso dan sosis sapi. Selain itu analisis secara biologi molekuler (*Real Time* PCR) juga menunjukkan bahwa metode yang dikembangkan ini dapat diandalkan dan spesifisitas daging tikus (*Rattus norvegicus*) dalam bakso dan sosis sapi. Oleh karena itu, semua metode analisis fisikokimia dan biologi molekuler ini cocok digunakan sebagai metode standar untuk analisis autentikasi halal.

**Kata kunci:** *Rattus norvegicus*, spektroskopi FTIR, spektroskopi  $^1\text{H}$  NMR, GCMS, *Real-Time* PCR, autentikasi halal.



## ABSTRACT

The halalness of a food product is very important for Muslims. Some unethical producers have mixed cheaper non-halal meat with higher-priced halal meat. Identifying meat in food products is important for halal and haram issues and ethical violations in general. Therefore, an effective analytical method for detecting non-halal meat in processed food products is very necessary. This research aims to develop physicochemical and molecular biology analysis methods to identify the presence of rat meat in processed meat food products such as meatballs and beef sausages. Lipid components in reference meatballs and sausages containing beef, rat meat or binary mixtures were extracted using the Bligh Dyer, Folch and Soxhlet methods. The extracted lipid components were then analyzed using FTIR spectroscopy and each sample was scanned three times in the wave number region of 4000-650  $\text{cm}^{-1}$ . Metabolomics analysis uses  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy to detect the presence of rat meat in reference meatball and sausage samples. The results of the FTIR spectrum and  $^1\text{H}$  NMR spectrum obtained were used as variables in the chemometric modelling of supervised pattern recognition and multivariate calibration. Analysis using GCMS begins with lipid extraction from raw meat of *Rattus norvegicus*, cows, chickens, pigs and dogs using the Bligh Dyer method, then derivatized to obtain methyl esters which are then injected into the GCMS instrument. The GCMS data was then processed using unsupervised pattern recognition chemometrics to group *Rattus norvegicus* lipids with other animal lipids (cows, chickens, pigs and dogs). Real Time PCR analysis uses species-specific primers targeting NADH dehydrogenase subunit 6 (ND6) to identify mouse meat. DNA was extracted using the FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit, and the extracted DNA was seen for concentration and purity index using NANO-Quant SPARK TECAN. The annealing temperature ( $T_a$ ) was used to provide the optimum amplification reaction, and several performance characteristics were evaluated for Real Time PCR, including sensitivity, efficiency, and repeatability. The results of this research showed that lipid yields obtained from reference meatballs and sausages showed that Soxhlet extraction gave better results compared to using the Bligh Dyer method or the Folch method. Linear Discriminant Analysis can classify meatballs and sausages (beef, rat and a mixture thereof) in the wavenumber area of 3100-800  $\text{cm}^{-1}$  for meatballs and in the wavenumber area of 3100-700  $\text{cm}^{-1}$  for sausages with an accuracy level of 100% and Partial Least Multivariate Calibration Square (PLS) uses optimal conditions because it provides an  $R^2$  value that is close to 1 and the RMSEC and RMSEP values are close to 0. The results of  $^1\text{H}$  NMR spectra obtained amino acid metabolites (alanine, aspartic acid, creatine, betaine, glutamine, isoleucine and valine), dipeptides, butyric acid, organic acids (acetate, formate and pyruvate), vitamins (biotin), sugars (glucose and glycerol), nucleosides (inosine), energy-related metabolites (lactate, carnitine and ADP/AMP/ATP), and dimethylamine. The typical metabolite obtained in mice is

butyric acid, and the typical metabolism in beef is choline, glucose, glutamine, valine and pyruvic acid. The combination with PLS-DA chemometrics shows a high goodness of fit model and fairly good predictability. The results of GCMS analysis show that rats (*Rattus norvegicus*) have saturated and unsaturated fatty acids. Saturated fatty acids in rats (*Rattus norvegicus*) are lauric acid, myristic acid, palmitic acid, stearic acid and arachidic acid. Meanwhile, unsaturated fatty acids in rats (*Rattus norvegicus*) are palmitoleic acid, vaccinic acid, oleic acid, linoleic acid and eucosatrienoic acid. The use of Principal Component Analysis (PCA) can successfully classify rat fat (*Rattus norvegicus*) and other animal fats. In Real Time PCR analysis, primers were obtained (Forward: CAAGCTTCGGGTACTCCTC and Reverse: GATTGTTAGTGGATGTATTGGGTGC; Product length: 150; (ND6) Genbank MW209726.1 at an optimum annealing temperature of 59.0°C and Cq of 16.848. Efficiency value of raw rat meat, meatballs The reference and reference sausages met the linearity curve criteria, namely 90-110%. The sensitivity test obtained an  $r^2$  value close to 1 and the LOD for raw rat meat and reference meatballs was 97.66 pg/ $\mu$ L, while for the reference sausage the LOD value was 48.83 pg/ $\mu$ L. The repeatability test obtained a CV value of <25% for raw rat meat, reference meatballs and reference sausages. Physicochemical analysis methods (FTIR spectroscopy,  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy and GCMS) combined with chemometrics showed that the method was effective and reliable for rat meat authentication (*Rattus norvegicus*) in beef meatballs and sausages. Furthermore, molecular biology analysis (Real Time PCR) also shows that the method developed is reliable and specific for rat (*Rattus norvegicus*) meat in beef meatballs and sausages. Therefore, all of these physicochemical and molecular biology analysis methods are suitable to be used as standard methods for halal authentication analysis.

**Keywords:** *Rattus norvegicus*, FTIR spectroscopy,  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy, GCMS, Real Time PCR, halal authentication.

