

INTISARI

Produk olahan tembakau–rempah merupakan produk yang mengalami proses fermentasi non-konvensional. Selama proses tersebut, komposisi metabolit dan komunitas bakteri di dalam produk dapat berubah. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis perubahan profil metabolit, komunitas bakteri, dan prediksi fungsi mikroba selama fermentasi, serta melihat pengaruh penambahan formula rempah terhadap perubahan tersebut. Analisis metabolit dilakukan menggunakan LC-HRMS, komunitas bakteri dianalisis menggunakan metabarcoding 16S rRNA, dan prediksi fungsi mikroba dilakukan menggunakan PICRUSt2. Hasil LC-HRMS menunjukkan bahwa sebanyak 70 metabolit berhasil dianotasi, dengan kelompok utama berupa senyawa fenolik, lipid, alkaloid, asam organik, benzenoid, dan organoheterosiklik. Hasil PCA menunjukkan bahwa sampel awal terpisah dari sampel fermentasi, sehingga menunjukkan adanya perubahan profil metabolit setelah fermentasi. Perlakuan dengan dan tanpa penambahan formula rempah juga menunjukkan pemisahan, yang menandakan bahwa formula rempah ikut membedakan profil metabolit antarperlakuan. Pada fermentasi 14 hari dengan penambahan formula rempah, beberapa senyawa fenolik dan flavonoid lebih tinggi secara relatif, sedangkan fermentasi hingga 35 hari menunjukkan perubahan yang lebih jelas pada kelompok lipid dan asam organik. Analisis komunitas bakteri menunjukkan adanya pergeseran komposisi setelah fermentasi. Komunitas bakteri yang pada sampel awal didominasi oleh *Pseudomonas* bergeser menjadi didominasi oleh *Cellvibrio* pada sampel fermentasi 14 hari dengan penambahan formula rempah. Hasil PICRUSt2 memperkirakan bahwa pada sampel fermentasi 14 hari dengan penambahan formula rempah, potensi jalur *nicotine degradation III* dan *ketogluconate metabolism* lebih tinggi dibandingkan sampel awal. Sebaliknya, beberapa jalur seperti *gallate degradation II*, *L-isoleucine biosynthesis*, *phospholipid biosynthesis*, *fatty acid β -oxidation I*, dan *protocatechuate degradation II* diprediksi lebih rendah. Hasil ini menunjukkan bahwa fermentasi non-konvensional dan penambahan formula rempah berkaitan dengan perubahan metabolit, komunitas bakteri, dan potensi fungsi mikroba pada produk olahan tembakau–rempah. Dalam konteks masyarakat, hasil ini membantu menjelaskan bahwa fermentasi bukan hanya proses penyimpanan, tetapi juga berkaitan dengan perubahan kimia dan mikrobiologis pada produk.

Kata Kunci: Fermentasi non-konvensional, LC-HRMS, *untargeted metabolomics*, *metabarcoding* 16S rRNA, PICRUSt2

ABSTRACT

Tobacco–spice products may undergo chemical and microbiological changes during non-conventional fermentation. This study evaluated the metabolite profile, bacterial community, and predicted microbial functions of the *TM* tobacco–spice product by comparing samples with and without an additional spice formula. Metabolites were analyzed using LC-HRMS, bacterial communities were examined through 16S rRNA metabarcoding, and microbial functions were predicted using PICRUSt2. LC-HRMS analysis annotated 70 metabolites, mainly consisting of phenolic compounds, lipids, alkaloids, organic acids, benzenoids, and organoheterocyclic compounds. PCA separated the initial sample from the fermented samples, indicating that fermentation altered the metabolite profile from the starting condition. Samples with and without the additional spice formula were also separated, suggesting that the formula contributed to metabolite differences between treatments. The 14-day fermented sample with the additional spice formula showed higher relative abundance of several phenolic and flavonoid compounds, whereas 35-day fermentation showed a stronger shift in lipid and organic acid compounds. The bacterial community also changed after fermentation. The initial sample was dominated by *Pseudomonas*, while the 14-day fermented sample with the additional spice formula was dominated by *Cellvibrio*. PICRUSt2 predicted higher nicotine degradation III through the VPP pathway and ketogluconate metabolism, while several other pathways were lower. Overall, non-conventional fermentation and the additional spice formula were associated with changes in metabolites, bacterial composition, and predicted microbial functions.

Keywords: Non-conventional fermentation, LC-HRMS, metabolite profile, 16S rRNA metabarcoding, PICRUSt2.