

## ISOLASI, KARAKTERISASI, DAN IDENTIFIKASI BAKTERI HALOFILIK PENGHASIL PROTEASE DARI IKAN ASIN LAYUR (*Trichiurus lepturus*) DI PASAR BERINGHARJO YOGYAKARTA

Alfinda Pramesty<sup>1</sup>, Anna Rakhmawati<sup>2</sup>

Departemen Pendidikan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Negeri Yogyakarta

\*e-mail: [Alfindapramesty.2018@student.uny.ac.id](mailto:Alfindapramesty.2018@student.uny.ac.id)

**Abstrak.** Pembuatan ikan asin layur (*Trichiurus lepturus*) menggunakan ikan air laut dari genus *Trichiurus* yang berpotensi mengandung bakteri halofilik. Ikan asin memiliki potensi besar sebagai sumber biomassa penghasil enzim protease yang tahan terhadap kadar garam tinggi (halostabil). Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui karakteristik dan genus, serta hubungan kekerabatan antar isolat bakteri halofilik penghasil protease dari ikan asin layur (*T. Lepturus*) di Pasar Beringharjo Yogyakarta. Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif eksploratif dengan metode observasi. Pengambilan sampel ikan asin layur (*T. lepturus*) dilakukan pada 3 kios pedagang berbeda berdasarkan daerah hasil produksi pengolahan ikan asin tersebut. Sampel selanjutnya diisolasi pada media selektif *Skim Milk Agar* + 3% NaCl untuk menumbuhkan bakteri halofilik penghasil protease. Isolat bakteri yang didapatkan kemudian dimurnikan dan dilakukan karakterisasi fenetik meliputi morfologi koloni dan sel, fisiologis (biokimia), serta kemampuan tumbuh pada kadar NaCl 0%, 10%, dan 20%. Data yang diperoleh digunakan untuk identifikasi dengan metode *matching profile* berdasarkan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Hubungan kekerabatan antar isolat bakteri diklasifikasikan menggunakan software MVSP 3.1 dengan algoritma pengklasteran UPGMA dan dikonstruksikan dalam bentuk dendrogram. Hasil penelitian menunjukkan terdapat 7 isolat bakteri halofilik penghasil protease dari ikan asin layur (*T. lepturus*) yang berhasil diisolasi dari kios pedagang berbeda yaitu 3 isolat berasal dari kios A, 3 isolat berasal dari kios B, dan 1 isolat berasal dari kios C. konstruksi dendrogram menunjukkan 9 kluster bakteri. Terdapat 2 isolat bakteri yang memiliki indeks similaritas  $\geq 83\%$  terhadap acuan *Staphylococcus* sp. yaitu isolat A5 dan C6. Sebanyak 4 isolat bakteri yang memiliki indeks similaritas  $\geq 67\%$  terhadap *Salinococcus* sp. yaitu A6, A8, B5, dan B6. Serta 1 isolat bakteri yang memiliki indeks similaritas 83% terhadap strain acuan *Halomonas* sp. yaitu isolat B6.

**Kata kunci :** *Isolasi, Bakteri Halofilik, Proteolitik, Karakter Fenetik.*

**Abstract.** *The production of layur salted fish (Trichiurus lepturus) using seawater fish from the genus of Trichiurus which has a great potential as a source of halophilic bacteria. Layur salted fish is an ideal source of protease-producing biomass that are resistant to high salinity environments (halostable). The aims of this study was to determine the characteristics and genus, as well as the kinship between isolates of halophilic bacteria producing protease from layur salted fish (T. lepturus) in Beringharjo Market, Yogyakarta. This research is a descriptive-*

*exploratory research with observation method. Sampling of layur salted fish (*T. lepturus*) was carried out at 3 different kiosk based on the area of production of the salted fish processing. The sample was isolated on a selective medium of Skim Milk Agar + 3% NaCl to grow protease-producing halophilic bacteria. The bacteria obtained were then purified and subjected to phenetic characterization including colony and cell morphology, physiology (biochemistry), and the ability to grow at 0%, 10%, and 20% NaCl levels. The data obtained were used for identification with the matching profile method based on Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The relationship between bacterial isolates was classified using MVSP 3.1 software with the UPGMA clustering algorithm and constructed in the form of a dendrogram. The results showed that there were 7 isolates of protease-producing halophilic bacteria from layur salted fish (*T. lepturus*) which were isolated from different kiosk, 3 isolates from kiosk A, 3 isolates from kiosk B, and 1 isolate from kiosk C. Dendrogram construction shows 9 bacterial clusters. There are 2 bacterial isolates that have a similarity index of 83% to the reference *Staphylococcus* sp. namely isolates A5 and C6. There are 4 bacterial isolates that had a similarity index of 67% to *Salinococcus* sp. namely A6, A8, B5, and B6. And 1 bacterial isolate which has a similarity index of 83% to the reference strain *Halomonas* sp. namely isolate B6.*

**Keyword : Isolation, Halophilic bacteria, Protease, Phenetic character**

## **PENDAHULUAN**

Indonesia merupakan negara maritim yang kaya produk hasil perikanan. Ikan asin merupakan produk awetan ikan air laut maupun ikan air tawar melalui proses penggaraman dan pengeringan (Adawyah, 2007). Menurut Rahmawaty (2021) ikan layur memiliki nilai ekonomis tinggi dan telah menjadi komoditas ekspor. Ikan asin layur (*Trichiurus lepturus*) termasuk ikan asin yang populer dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia sebagai sumber protein karena hampir tersebar di seluruh perairan Indonesia. Hal tersebut dikarenakan ikan asin layur (*T. lepturus*) memiliki harga relatif lebih murah dibandingkan dengan sumber protein hewani lainnya seperti daging ayam dan daging sapi. Menurut data statistik Dinas Perikanan dan Kelautan DIY (2022) harga ikan asin layur (*T. lepturus*) di pasar tradisional Yogyakarta berkisar antara Rp. 25.000–Rp. 80.000 per kilogram pada tahun 2017. Salah satu pasar tradisional terbesar di Yogyakarta ialah Pasar Beringharjo yang telah menjadi pusat kegiatan ekonomi Yogyakarta sejak pertama kali dibangun pada tahun 1758 (Herliana, 2015). Pasar Beringharjo menawarkan beberapa komoditas ikan, salah satunya adalah ikan olahan berupa ikan asin yang berasal dari *supplier* luar daerah seperti Cilacap, Kutoarjo, Tuban, dan lainnya.

Pembuatan ikan asin layur (*T. Lepturus*) umumnya menggunakan ikan air laut dari genus *Trichiurus* yang berpotensi mengandung bakteri halofilik. Hewan yang berasal dari lingkungan laut dapat mengandung bakteri halofilik seperti *Vibrio* dan *Micrococcus* (Tatang & Wardah, 2014). Bakteri halofilik merupakan kelompok bakteri yang dapat hidup di lingkungan berkadar garam tinggi dengan cara menyeimbangkan tekanan osmotik sel dan lingkungan (Rajendran, 2015). Kelompok bakteri halofilik dapat dibedakan berdasarkan kebutuhan terhadap Natrium Klorida (NaCl) dan pertumbuhan optimal pada konsentrasi NaCl yang berbeda (Samad *et al.*, 201). Menurut Kushner & Kamekura (1988) dalam Hozzein (2015) bakteri halofilik dibagi menjadi tiga kelompok yaitu halofilik ekstrim (*extreme halophiles*), halofilik sedang (*moderate halophiles*), dan halofilik rendah (*slight halophiles*). Pertumbuhan bakteri dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti nutrisi dan lingkungan fisik (suhu, pH, kadar garam) (Pelczar & Chan, 2015). Bakteri halofilik ditemukan pada lingkungan berkadar garam tinggi seperti danau air asin, ladang pemanenan garam, tanah atau gurun berkadar garam tinggi, dan makanan yang diawetkan dengan

penggaraman (Ventosa *et al.*, 1998; Kumar *et al.*, 2012). Penelitian Adriyani (2006), Savitri (2006), Fifendy (2017), dan Riski (2017) menemukan bakteri halofilik pada berbagai jenis ikan asin seperti ikan asin teri, ikan asin peda, ikan asin jambal roti, ikan asin talang-talang, dan lainnya. Umumnya bakteri halofilik yang ditemukan pada produk makanan seperti ikan asin menyebabkan kerusakan produk, yaitu *Pink Spoilage* yang menimbulkan pigmen berwarna kuning kemerahan sehingga ikan asin menjadi lunak, berwarna pucat keabuan, serta menimbulkan bau busuk dan tengik (Asrori, 2019: 52).

Dibandingkan dengan dampak negatifnya, bakteri halofilik memiliki potensi tinggi di bidang bioteknologi. Potensi bioteknologi tersebut menurut Mohammadipah (2015) yaitu sebagai penghasil enzim dan *compatible solute* (protein, dna, sel protektor), sebagai alternatif agen bioremediasi pencemaran lingkungan, sebagai kontrol biologi terhadap hama dan pemupukan pada agro-industri, penghasil biopolimer (produksi biosurfaktan, exopolysaccharide, bioplastik), penghasil senyawa terapeutik (antibakteri, antivirus, antitumor), serta industri fermentasi makanan. Penelitian sebelumnya juga menjelaskan bahwa bakteri halofilik merupakan sumber yang ideal menghasilkan enzim yang halostabil karena kemampuannya untuk melakukan katalisis di bawah salinitas tinggi (Karan *et al.*, 2012; Samad, *et al.*, 2017). Bakteri halofilik tidak hanya menghasilkan enzim ekstraseluler yang tahan terhadap kadar garam tinggi (halostabil), namun juga tahan terhadap temperatur dan pH tinggi (Gomez, 2004; Rohban, 2009).

Salah satu enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh bakteri halofilik adalah enzim protease. Enzim ini termasuk kedalam kelompok enzim hidrolase yang mampu menghidrolisis protein menjadi asam amino (Delgado-García, *et al.*, 2015). Enzim protease telah lama dimanfaatkan dalam industri pangan, industri kimia, fotografi, penyamakan kulit, biomedis, dan deterjen (Raval, 2015). Secara umum enzim protease ditemukan pada setiap organisme meliputi hewan dan tumbuhan karena secara fisiologi diperlukan oleh organisme tersebut untuk bertahan hidup (Arfarita, 2015). Namun enzim protease yang dihasilkan mikroorganisme seperti bakteri memiliki beberapa kelebihan, seperti mikroba penghasil enzim mudah dan cepat ditumbuhkan, mutu yang dihasilkan seragam, harga lebih murah, dapat diproduksi dalam jumlah besar, dan produktivitasnya lebih mudah ditingkatkan (Munifah, 2019). Menurut Pelczar & Chan (2015) aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, pH, dan suhu. Penelitian oleh Kumar (2012) dan Samad (2017) mengkaji bakteri halofilik penghasil enzim protease yang mampu hidup pada lingkungan dengan kadar NaCl 5-20%. Dari penelitian tersebut diperoleh isolat bakteri yang diidentifikasi sebagai anggota genus *Virgibacillus*, *Geomicrobium*, *Oceanobacillus*, dan *Bacillus*.

Meningkatnya pemanfaatan enzim protease dalam berbagai bidang industri memerlukan kajian yang lebih luas mengenai sumber penghasil enzim protease agar kebutuhan terhadap enzim ini dapat terpenuhi. Ikan asin diduga memiliki potensi besar sebagai sumber biomassa penghasil enzim protease yang tahan terhadap kadar garam tinggi (halostabil). Hal tersebut mendorong dilakukannya eksplorasi mengenai isolasi dan identifikasi terhadap bakteri halofilik penghasil protease yang didapatkan dari ikan asin layur (*T. Lepturus*) dengan harapan bakteri yang ditemukan dapat menjadi sumber baru penghasil enzim protease halostabil. Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan isolat bakteri halofilik penghasil protease yang diisolasi dari ikan asin layur (*T. lepturus*) di Pasar Beringharjo Yogyakarta, mengetahui genus bakteri halofilik penghasil protease yang diisolasi dari ikan asin layur (*T. lepturus*) di Pasar Beringharjo Yogyakarta, serta mengetahui hubungan kekerabatan antar isolat bakteri halofilik penghasil protease berdasarkan indeks similaritas.

## **METODE**

Penelitian ini dilakukan di di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Yogyakarta, yakni untuk proses analisa sampel, isolasi, karakterisasi, dan identifikasi bakteri. Waktu yang diperlukan dalam penelitian ini adalah lima bulan dimulai pada bulan Februari 2022 hingga bulan Juni 2022. Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif eksploratif dengan metode observasi untuk mendapatkan isolat bakteri halofilik penghasil protease pada ikan asin layur (*T. lepturus*) di Pasar Beringharjo Yogyakarta.

Alat-alat yang digunakan terdiri dari mortar dan alu, refraktometer garam, pipet tetes, vortex, tabung reaksi, pH meter, cawan petri, inkubator, colony counter, gelas benda dan penutup, lampu bunsen, mikroskop, lemari pendingin, erlenmeyer, spektrofotometer, shaker, gelas beaker, gelas ukur, jarum ose loop dan jarum, autoklaf, hotplate, timbangan analitik, dan alat bantu lainnya, dan adapun bahan yang digunakan yaitu medium pertumbuhan bakteri NA (*Nutrient Agar*) Merck, SIM (*Sulfide Indole Motility*) Oxoid, *Phenol Red, Nutrient Gelatin* Oxoid, Oxoid, SA (*Starch Agar*) Merck, *Nitrat Broth*, MR-VP (*Methyl Red Voges-Proskauer*) *Broth*, *Simmons Citrate Agar* Oxoid, dan NB (*Nutrient Broth*) Merck. Larutan dan reagen yang digunakan meliputi 1% *Skim Milk Powder* Oxoid, akuades, NaCl, Tween 80, Rhodamine-B, Kristal Violet, Larutan iodine, lugol, alkohol 96% dan alkohol 70%, larutan safranin, *malachite green*, larutan karbohidrat (glukosa, laktosa, sukrosa), reagen Kovac's, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *Methyl Red*, larutan A (asam sulfanilat) dan larutan B (alfa-naftilamin), reagen Barritt's A dan B, dan serbuk zinc. Serta bahan lainnya seperti kapas, aluminium foil, dan kertas wrap.

Penelitian ini dilakukan dalam 4 tahap yaitu analisis sampel, isolasi bakteri dari ikan asin layur, karakterisasi, dan identifikasi isolat bakteri yang diperoleh dari hasil isolasi. Analisa sampel dilakukan dengan melakukan pengukuran kadar garam, nilai pH, dan nilai *Total Plate Count* (TPC). Sampel selanjutnya diisolasi pada media selektif *Skim Milk Agar* + 3% NaCl untuk menumbuhkan bakteri halofilik penghasil protease. Isolat bakteri yang didapatkan kemudian dimurnikan pada media *Nutrient Agar* + 3% NaCl dengan metode goresan *quadran streak plate*. Isolasi dan pemurnian dapat dilakukan beberapa kali hingga mendapatkan isolat tunggal di setiap cawan. Karakterisasi fenetik isolat bakteri meliputi morfologi koloni dan sel, fisiologis (biokimia), serta kemampuan tumbuh pada kadar NaCl 0%, 10%, dan 20%. Data yang diperoleh digunakan untuk identifikasi dengan metode matching profile berdasarkan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Hubungan kekerabatan antar isolat bakteri diklasifikasikan menggunakan software MVSP 3.1 dengan algoritma pengklasteran UPGMA dan dikonstruksikan dalam bentuk dendogram.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Hasil**

Tahap awal yang dilakukan dalam penelitian ini adalah analisis sampel yang bertujuan untuk mengetahui kondisi fisik dan karakteristik sampel sebagai informasi awal sebelum dilakukan isolasi dan karakterisasi bakteri yang terdapat di dalamnya. Sampel yang digunakan sebagai sumber isolat adalah ikan asin layur (*T. lepturus*) dari pedagang di Pasar Beringharjo Yogyakarta. Pengambilan sampel ikan asin layur (*T. lepturus*) dilakukan pada 3 kios pedagang berbeda berdasarkan daerah hasil produksi pengolahan ikan asin tersebut. Hasil Analisis sampel ikan asin layur (*T. lepturus*) ditunjukkan pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Analisis Sampel Ikan Asin Layur

Parameter	Hasil		
	A	B	C
Kadar garam	3 %	3 %	3 %
pH	6,1	5,9	6,9
Total Plate Count (TPC)	3,8 x 10 <sup>6</sup> per gram sampel	9 x 10 <sup>8</sup> per gram sampel	1,61 x 10 <sup>7</sup> per gram sampel

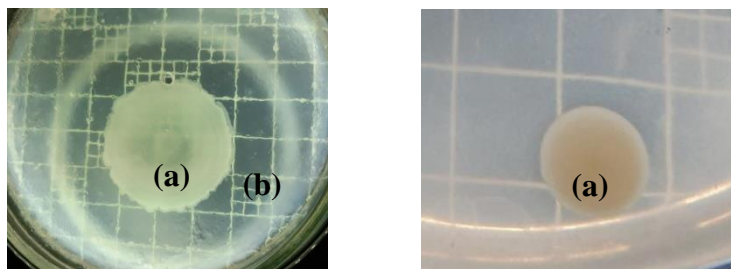
Hasil pengukuran menunjukkan kadar garam, nilai pH, dan nilai TPC sampel ikan asin layur (*T. lepturus*) memenuhi syarat mutu dan keamanan pangan SNI (BSN, 2016). Konsentrasi garam rendah sekitar 1-3% membantu pertumbuhan bakteri halofilik (Adawyah, 2009). Berdasarkan hasil pengukuran kadar garam pada sampel ikan asin layur, dapat diperkirakan bahwa bakteri yang akan terisolasi dari sampel kemungkinan termasuk ke dalam *moderate halophiles* atau halofilik sedang. Pengukuran kadar garam dan pH pada sampel ikan asin layur (*T. lepturus*) berguna untuk menentukan kondisi pH dan konsentrasi garam yang harus ditambahkan pada medium pertumbuhan bakteri yang akan diisolasi. Selain untuk mengetahui mutu suatu produk, pada penelitian ini koloni bakteri yang tumbuh dari hasil TPC juga digunakan untuk isolasi dan identifikasi bakteri yang ada pada produk tersebut.

Sampel yang diperoleh selanjutnya ditanam dalam media isolasi *Skim Milk Agar* sebagai media selektif untuk menumbuhkan bakteri halofilik penghasil protease serta perhitungan TPC. Koloni bakteri yang tumbuh kemudian diseleksi untuk memilih isolat penghasil protease (bakteri proteolitik). Aktivitas proteolitik ditandai dengan terbentuknya zona proteolisis berupa zona bening di sekitar isolat pada media isolasi (Gambar 1). Tahapan ini berhasil mengisolasi 7 koloni bakteri yang diduga merupakan isolat bakteri halofilik penghasil protease yang berbeda. Hasil Isolasi bakteri dan indeks proteolitik dapat dilihat pada Tabel 2 berikut ini.

**Tabel 2.** Isolat bakteri halofilik dan Indeks Proteolitik

No	Kode isolat	Diameter	Diameter	Indeks	Kategori IP*
		koloni (mm)	zona bening (mm)	proteolitik (mm)	
1.	A5	2,5	4,5	1,8	Sedang
2.	A6	1,7	19,3	11,45	Tinggi
3.	A8	7,1	10,6	1,49	Sedang
4.	B5	1,5	7,3	4,8	Tinggi
5.	B6	1,8	6,7	3,72	Tinggi
6.	B8	32,2	50,5	1,56	Sedang
7.	C6	1,1	4,4	4	Tinggi

\* Kategori IP : IP ≤ 1 rendah; IP 1-2 sedang; IP ≥ 2 tinggi (Choi *et al*, 2005)



**Gambar 1.** Aktivitas proteolitik  
(a) Koloni bakteri (b) Zona bening

Pada penelitian ini, penambahan *Skim Milk Powder* berfungsi untuk menunjukkan aktivitas hidrolitik protease. Susu skim mengandung kasein yang berguna sebagai substrat enzim (Susanti & Fibriana, 2017). Bakteri dengan kemampuan menghidrolisis protease (proteolitik) ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening disekitaran koloni akibat media *Skim Milk Agar* terhidrolisis menjadi senyawa sederhana seperti peptida dan asam amino yang sifatnya terlarut dalam media. Protease bertugas mengkatalisis degradasi kasein dengan memutuskan ikatan peptida CO-NH dengan masuknya air kedalam molekul (Cappucino & Welsh, 2018). Besarnya aktivitas enzim protease ditunjukkan dengan semakin lebarnya zona bening, tetapi besarnya aktivitas enzim protease yang berperan merombak protein dalam media padat hanya dapat diketahui dan diukur secara kuantitatif.

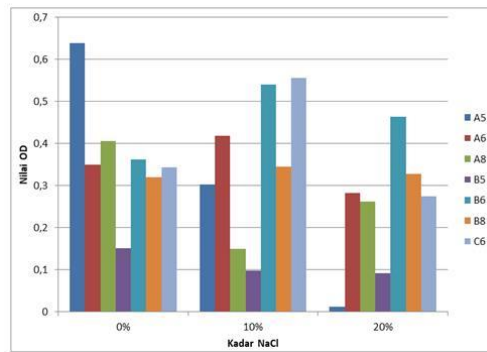
Nilai Indeks Proteolitik (IP) menunjukkan besar aktivitas enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri. Indeks proteolitik didapatkan dengan cara membagi diameter zona bening dengan diameter koloni bakteri (Ibrahim *et al*, 2015; Fitriana & Asri, 2022). Menurut Choi *et al* (2015) nilai Indeks Proteolitik (IP) diklasifikasikan dalam kategori rendah jika nilai  $IP \leq 1$ , kategori sedang apabila nilai IP antara 1 sampai dengan 2, serta kategori tinggi jika nilai  $IP \geq 2$ . Hasil pada Tabel 4 menunjukkan bahwa seluruh isolat bakteri yang didapatkan memiliki kategori nilai Indeks Proteolitik (IP) sedang hingga tinggi. Nilai tersebut berkisar antara 1,49 pada isolat bakteri A8 hingga 11,45 pada isolat A6. Semakin besar nilai Indeks Proteolitik (IP) menunjukkan semakin besar kemampuan bakteri proteolitik dalam mengekskresikan enzim protease dan sebaliknya.

Sebelum dilakukan karakterisasi bakteri, terlebih dahulu campuran bakteri yang diperoleh saat tahap isolasi dipisahkan antara satu dengan yang lainnya, sehingga diperoleh isolat tunggal bakteri. Isolat bakteri yang membentuk zona bening dan menunjukkan karakteristik makroskopis berbeda dari segi bentuk, tepi, elevasi serta warna koloni diambil untuk dimurnikan ke dalam media agar cawan dengan metode *quadran streak plate*. Setelah diperoleh koloni tunggal bakteri kemudian dilakukan penyimpanan kultur bakteri dalam media agar miring. Isolat bakteri inilah yang selanjutnya diuji fenetik berupa morfologi koloni, morfologi sel, sifat fisiologis (biokimiawi) dan pengaruh pertumbuhan pada kadar NaCl berbeda. Hasil karakterisasi selanjutnya digunakan sebagai acuan dalam melakukan identifikasi bakteri. Hasil karakterisasi fenetik ketujuh isolat bakteri dapat dilihat pada Tabel 3.

**Tabel 3.** Karakteristik fenetik bakteri halofilik penghasil protease

No	Karakteristik fenetik	Kode isolat						
		A5	A6	A8	B5	B6	B8	C6
1.	Bentuk koloni	Irregular	Irregular	Circular	Irregular	Circular	Irregular	Irregular
2.	Warna	Putih-krem	putih	Putih-krem	kuning	Kuning-krem	Putih-krem	jungga
3.	Elevasi	Raised	Raised	Convex	Convex	Convex	Raised	Raised
4.	Tepian	Undulate	Undulate	Entire	Undulate	Entire	Undulate	Undulate
5.	Bentuk sel	Kokus	Kokus	Kokus	Kokus	Basil	Kokus	Kokus
6.	Pewarnaan gram	+	+	+	+	-	+	+
7.	Pewarnaan spora	-	-	-	-	-	-	-
8.	Uji motilitas	-	-	-	-	-	-	-
9.	Uji kebutuhan oksigen	Fakultatif Anaerob	Fakultatif Anaerob	Fakultatif Anaerob	Aerob	Fakultatif Anaerob	Anaerob	Aerob
10.	Uji fermentasi glukosa	+	-	-	-	-	-	+
11.	Uji fermentasi sukrosa	+	-	-	+	-	+	+
12.	Uji fermentasi laktosa	+	-	-	-	-	-	+
13.	Uji hidrolisis gelatin	+	-	-	-	-	-	+
14.	Uji hidrolisis pati	+	-	+	-	-	+	+
15.	Uji hidrolisis lemak	-	-	-	-	+	-	-
16.	Uji katalase	+	-	-	+	+	-	+

Uji pertumbuhan bakteri pada kadar NaCl yang berbeda dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri halofilik hidup pada kadar garam tertentu. Dalam uji ini digunakan tiga macam varian kadar garam yaitu kadar garam 0%, 10%, dan 20% (Gambar 2). Pengujian ini menggunakan media nutrient broth karena pengamatan koloni bakteri yang tumbuh dapat dilakukan dengan lebih mudah pada media cair .



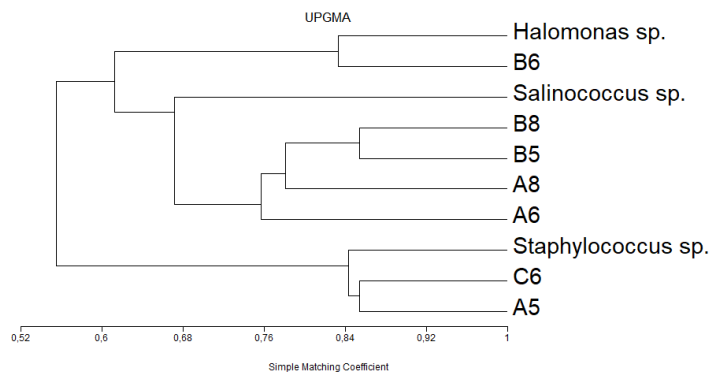
**Gambar 2.** Diagram Pertumbuhan Bakteri Halofilik pada Kadar NaCl Berbeda

Berdasarkan pengujian ini diketahui bahwa enam isolat bakteri halofilik dapat tumbuh pada kadar garam 0-20%. Sedangkan isolat A5 hanya dapat tumbuh pada kadar garam 0-10%.

Berdasarkan nilai OD pada uji pertumbuhan, nilai tertinggi isolat A5, A8, dan B5 berada pada kadar garam 0%. Hal tersebut menunjukkan bahwa ketiga isolat tersebut tumbuh optimal pada kadar garam 0% dibandingkan pada kadar garam 10% dan 20%. Diduga bahwa ketiga isolat ini termasuk kedalam kategori *slight halophile* atau halofilik rendah. Diduga perbedaan pertumbuhan tersebut terjadi disebabkan oleh kemampuan adaptasi isolat bakteri. Ventosa, *et al* (1988) dalam Adriani (2006) menyebutkan bahwa jumlah zat terlarut kompatibel yang disintesis akan bertambah seiring dengan penambahan kadar NaCl dalam media. Sehingga diduga jumlah zat terlarut kompatibel yang disintesis oleh isolat bakteri di kadar NaCl 10% dan 20% belum dapat menyeimbangkan tekanan osmotik dalam sel dengan luar sel bakteri tersebut. Nilai OD tertinggi dimiliki oleh isolat A6, B6, B8, dan C6 yaitu berada pada kadar garam 10%. Hal tersebut menunjukkan bahwa keempat isolat tersebut tumbuh optimal pada kadar garam 10% dibandingkan pada kadar garam 0% dan 20%. Diduga keempat isolat ini termasuk kedalam kategori *moderate halophiles* atau halofilik sedang. Perbedaan pertumbuhan ini terjadi disebabkan oleh kemampuan adaptasi isolat bakteri yang lebih baik. Keempat isolat ini dapat beradaptasi dengan cara mensintesis zat terlarut kompatibel. Zat terlarut kompatibel yang disintesis oleh isolat ini membentuk keseimbangan osmotik sel dan luar sel lebih baik daripada medium berkadar NaCl 0% dan 20%. Pada kadar NaCl 20%, kemampuan tumbuh seluruh isolat berkurang karena tidak dapat beradaptasi dalam kadar NaCl yang mendekati jenuh.

NaCl atau garam memiliki kondisi pH netral antara 6,9-7. Kondisi ini mendukung aktivitas enzim protease yang dapat bekerja optimal pada pH 6-9. Pada kadar garam optimum diduga kecepatan reaksi enzim proteolitik akan meningkat akibat energi kinetik bertambah. Hal ini mempengaruhi peluang enzim dan substrat untuk bereaksi. Berdasarkan hasil pengujian, maka kecepatan reaksi enzim proteolitik yang dihasilkan oleh isolat bakteri halofilik diduga akan bereaksi lebih optimal pada kadar garam 0%-10% dibandingkan pada kadar garam 20%.

Hasil berbagai macam pengujian ini selanjutnya digunakan sebagai dasar dalam melakukan identifikasi fenetik. Data-data yang terhimpun dibuat dalam notasi biner dengan angka 1 untuk hasil positif dan angka 0 untuk hasil negatif. Ditambahkan pula dengan karakter fenetik dari strain acuan berupa *Staphylococcus* sp., *Salinococcus* sp., dan *Halomonas* sp.. Pemilihan strain acuan ini didasarkan adanya kemiripan dengan isolat uji berdasarkan *Simple Profile Matching* yang dilakukan menggunakan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9<sup>th</sup> Edition)*. Menggunakan aplikasi MVSP 3.1 selanjutnya data tersebut dikonstruksikan menjadi bentuk dendrogram. Hasil konstruksi dendrogram tersebut ditampilkan dalam Gambar 3 berikut ini.



**Gambar 25.** Dendrogram Keanekaragaman Fenetik Isolat Bakteri Halofilik Penghasil Protease



Dendogram tersebut menunjukkan tingkat kemiripan antar isolat bakteri halofilik penghasil protease. Semakin tinggi tingkat kemiripannya maka kekerabatan antar isolat bakteri tersebut semakin besar. Pada dendogram menunjukkan adanya 9 kluster bakteri yang menunjukkan karakter fenetik yang berbeda-beda. Tingkat kemiripan bakteri uji dengan strain acuan dapat dilihat pada Tabel 4 berikut ini.

**Tabel 4.** Matriks similaritas *Simple Matching Coefficient*

Isolat Bakteri	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Salinococcus</i> sp.	<i>Halomonas</i> sp.
A5	<b>85%</b>	58%	44%
A6	67%	<b>67%</b>	52%
A8	48%	<b>67%</b>	65%
B5	58%	<b>69%</b>	50%
B6	37%	60%	<b>83%</b>
B8	60%	<b>67%</b>	48%
C6	<b>83%</b>	56%	42%

Semakin tinggi indeks similaritas menunjukkan semakin dekat pula tingkat kemiripan pada isolat bakteri tersebut. Berdasarkan nilai indeks similaritas terdapat 2 isolat bakteri dengan indeks similaritas  $\geq 83\%$  terhadap acuan *Staphylococcus* sp.. Isolat bakteri tersebut yaitu A5 dan C6. Terdapat 4 isolat bakteri dengan indeks similaritas  $\geq 67\%$  terhadap *Salinococcus* sp.. Isolat bakteri tersebut yaitu A6, A8, B5, dan B6. Terdapat 1 isolat bakteri dengan indeks similaritas 83% terhadap strain acuan *Halomonas* sp. Isolat bakteri tersebut yaitu B6. Hasil ini menunjukkan bahwa isolat bakteri halofilik penghasil protease yang berhasil diisolasi dari ikan asin layur (*T. lepturus*) didominasi oleh isolat bakteri yang memiliki kemiripan terhadap bakteri *Salinococcus* sp. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh (Babavalian, *et al*, 2013) bahwa bakteri gram positif menunjukkan tingkat aktivitas enzim hidrolitik lebih tinggi pada enzim protease, amilase, dan kitinase dibandingkan dengan bakteri gram negatif yang menunjukkan tingkat aktivitas yang lebih tinggi pada enzim lipase dan selulase.

## Pembahasan

Penelitian sejenis oleh Adriani (2006) pada beberapa jenis ikan asin di pasar tradisional dan supermarket, ditemukan bakteri halofilik penghasil protease berupa *Salinococcus* sp. dan *Halomonas* sp. pada ikan asin teri dan ikan asin petek. Penelitian oleh Savitri (2006) menyebutkan ditemukan bakteri halofilik penghasil protease berupa *Staphylococcus* sp. pada ikan asin peda. Serta pada penelitian Riski (2017) ditemukan bakteri halofilik penghasil protease berupa *Staphylococcus aureus* pada ikan asin talang-talang. Selain pada ikan asin, bakteri halofilik penghasil protease berupa *Staphylococcus equorum* dan genus *Halomonas* juga ditemukan pada produk pangan fermentasi lain seperti keju (Kothe *et al*, 2021). Bakteri halofilik penghasil protease tidak hanya ditemukan pada produk pangan, namun juga ditemukan berasosiasi dengan lamun laut dan perairan garam (Rizaldi, 2018; Rathakrishnan&Gopalan, 2022).

Bakteri *Staphylococcus* yang diidentifikasi pada penelitian ini diduga tidak bersifat patogen. Menurut Savitri (2006) *Staphylococcus* bertanggung jawab terhadap pembentukan cita rasa dan tekstur khas yang dihasilkan produk ikan asin. Selain itu, aktivitas enzim proteinase sangat penting dalam proses fermentasi ikan asin. Hal tersebut karena ikan mengandung protein dalam jumlah yang besar sekitar 15-24 %. Aktivitas hidrolisis protein oleh bakteri selama proses fermentasi akan menyebabkan terbentuknya konsistensi masir, sehingga protein akan terdegradasi menjadi komponen yang lebih mudah dicerna oleh tubuh (Silvina, *et a.l*, 2018).

Rendahnya keanekaragaman isolat bakteri yang dapat diisolasi dari ikan asin layur (*T. lepturus*) diduga karna adanya kandungan bahan pengawet seperti formalin pada produk ikan asin. Ikan asin termasuk kedalam bahan makanan mentah yang menyebabkan ikan asin tidak tahan lama, sehingga berpotensi diberi bahan pengawet tambahan. Formalin atau formaldehid merupakan bahan yang beracun dan berbahaya bagi kesehatan manusia. Pengikatan formalin dengan protein produk ikan asin tidak hanya terbatas pada protein yang dimiliki oleh bakteri patogen, tetapi juga dengan protein dari sel ikan tersebut. Pengikatan formalin dengan protein dari jaringan akan membuat jaringan menjadi keras dan tidak larut didalam air. Hal ini menyebabkan protein ikan asin menjadi rusak sehingga kualitas ikan yang diberi formalin akan menurun. (Cahyadi, 2009: Fatimah, 2017). Penelitian oleh Wulandari, dkk, (2019) menunjukkan dari 20 sampel ikan asin yang diperoleh dari 10 pasar tradisional di Yogyakarta, 10 sampel diantaranya positif mengandung formalin dengan kadar 4.348-30.310 ppm. Serta pada penelitian Fatimah, 2017: 26) ditemukan 46,15% ikan asin teri nasi yang diperoleh dari pasar beringharjo dan pasar giwangan yogyakarta positif mengandung formalin.

Selain itu keanekaragaman isolat bakteri halofilik penghasil protease dipengaruhi oleh rendahnya pertumbuhan bakteri sampel ikan asin layur (*T. lepturus*). Menurut penelitian yang dilakukan Silvina *et al.* (2018) menunjukkan keberadaan bakteri halofilik tidak ditemukan pada bulan pertama pengasinan. Keragaman isolat bakteri baru terlihat setelah dua bulan pengasinan hingga bulan kelima, setelahnya keragaman isolat bakteri kembali menurun. Hal tersebut diduga akibat perubahan kondisi lingkungan pada saat proses pengasinan ikan asin. Perubahan lingkungan dari aerofilik menjadi mikroaerofilik, ditambah dengan peningkatan kandungan NaCl menyebabkan stress dan mengurangi flora halofilik pada sampel. Pada penelitian ini, tidak diketahui secara pasti lama waktu pengasinan dan penyimpanan sampel ikan asin, sehingga diduga ikan keanekaragaman bakteri pada ikan asin telah menurun. Rendahnya pertumbuhan bakteri halofilik penghasil protease diduga disebabkan oleh beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim proteolitiknya seperti nutrisi, pH dan suhu pada media isolasi.

## **SIMPULAN**

Berdasarkan pada penelitian yang dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa Bakteri halofilik penghasil protease dapat diisolasi dari ikan asin layur (*T. lepturus*) di Pasar Beringharjo Yogyakarta. Sebanyak 7 isolat bakteri berhasil diisolasi dari kios pedagang berbeda yaitu 3 isolat berasal dari kios A, 3 isolat berasal dari kios B, dan 1 isolat berasal dari kios C. Berdasarkan hasil pengujian terhadap sifat morfologi dan fisiologi dari 7 isolat bakteri halofilik penghasil protease diduga isolat bakteri tersebut termasuk ke dalam anggota dari genus *Staphylococcus*, *Salinococcus*, dan *Halomonas*. Berdasarkan dendrogram keanekaragaman fenetik isolat bakteri halofilik penghasil protease dari ikan asin layur (*T. lepturus*) di Pasar Beringharjo didapatkan 9 kluster bakteri. Terdapat 2 isolat bakteri yang memiliki indeks similaritas  $\geq 83\%$  terhadap acuan *Staphylococcus* sp. yaitu isolat A5 dan C6. Terdapat 4 isolat bakteri yang memiliki indeks similaritas  $\geq 67\%$  terhadap *Salinococcus* sp. yaitu A6, A8, B5, dan B6. Dan terdapat 1 isolat bakteri yang memiliki indeks similaritas 83% terhadap strain acuan *Halomonas* sp. yaitu isolat B6.

## **UCAPAN TERIMA KASIH**

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Anna Rakhmawati, S.Si, M.Si. selaku dosen pembimbing yang telah memberikan arahan, bimbingan, serta dukungan hingga penelitian ini dapat terselesaikan dengan baik. Serta semua pihak yang telah memberikan bantuan yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abidin, Z., Redjeki, S., & Ambariyanto. (2013). Studi Kebiasaan Makanan Ikan Layur (*Trichiurus lepturus*) di Perairan Pantai Bandengan Kabupaten Jepara dan di Perairan Tawang Weleri Kabupaten Kendal. *Journal Of Marine Research*, 2(3), 95-103.
- Adawyah, R. (2014). *Pengelolaan dan Pengawetan Ikan (edisi kelima)*. Jakarta: Bumi Aksara.
- Adriyani, D. (2006). *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Halofilik dari Ikan Asin*. Skripsi, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Ahmad, M. Y. (2008). Model Pertumbuhan Ikan Layur (*Trichiurus lepturus* Linnaeus, 1758) di Palabuhanratu, Jawa Barat. *Journal Of Agrosience*, 1(1), 1-11.
- Ambarsari, H., & Miswanto. Kinerja Konsorsium Bakteri Dari Sungai Opak Yogyakarta Dalam Reduksi Nitrat Dengan Sumber Karbon Yang Berbeda. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Pengelolaan Limbah Pusat Teknologi Limbah Radioaktif – BATAN*, Indonesia, 14, 37-46.
- Amoozegar, M.A. & Siroosi, M. (2015). Hydrolytic Enzymes in Halophilic Bacteria, Properties and Biotechnological Potential. Dalam Maheshwari, D.K. & Saraf, M. (Eds.), *Halophiles Biodiversity and Sustainable Exploitation* (pp.355-378). Switzerland : Springer International Publishing.
- Arfarita, N. (2015). Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Penghasil Protease Yang Diskrining Dari Terasi. *El-Hayah*, 5(3), 119-122.
- Asrori. (2019). *Cara Membuat Ikan Asin (Edisi digital)*. Semarang: Alprin.
- Babavaliana, H., et al. (2013). Isolation and Identification of Moderately Halophilic Bacteria Producing Hydrolytic Enzymes from the Largest Hypersaline Playa in Iran. *Microbiology*, 82(4): 466-474.
- Badan Standarisasi Nasional (BSN). (2016). Produk Ikan dan Produk Perikanan yang Diasinkan. Diakses pada 27 Juli 2022 dari <http://sispk.bsn.go.id/SNI/DetailSNI/10916>
- Cappucino, J.G. & Welsh, C. (2018). *Microbiology A Laboratory Manual (11<sup>th</sup> Edition)*. UK : Pearson Education Limited.
- Choi, Y.W., Hodgkiss, I.J & Hyde, K.D. (2005). Enzyme production by endophytes of *Brucea javanica*. *Journal of Agricultural Technology* , 1(1): 55-66.
- Das, O., Kumar, S. H., & Nayak, B. B. (2019). Relative abundance of halophilic archaea and bacteria in diverse salt-fermented fish products. *LWT-Food Science and technology*, 117: 108688.
- Delgado-García, M., et al. (2015). Isolation and Screening of Halophilic Bacteria for Production of Hydrolytic Enzymes. Dalam Maheshwari, D.K. & Saraf, M. (Eds.), *Halophiles Biodiversity and Sustainable Exploitation* (pp.379-402). Switzerland : Springer International Publishing.
- Dinas Kelautan dan Perikanan DIY. (2022). Statistik Informasi Harga Ikan Olahan (*Update 01 November 2017*). Diakses pada 03 Maret 2022 dari [https://dislautkan.jogjaprovo.go.id/web/hargaikan\\_olahan](https://dislautkan.jogjaprovo.go.id/web/hargaikan_olahan)
- Fatimah, S., Astuti, D. W., & Awalia, N. H. (2017). Analisis Formalin Pada Ikan Asin Di Pasar Giwangan Dan Pasar Beringharjo Yogyakarta. *Analit: Analytical and Environmental Chemistry*, 2(1), 22-28.
- Fifendy, M. (2017). *Mikrobiologi (Edisi pertama)*. Depok: Kencana.
- Fifendy, M., Ratriana, F, & Irdawati. (2017). Isolasi dan Identifikasi Bakteri Halofilik Ikan Talang (*Chorinemus* sp.) dari Aia Bangih Pasaman Barat. *BioScience* , 1(2), 21-28.

- Fitriana, N., & Asri, M. T. (2022). Aktivitas Proteolitik pada Enzim Protease dari Bakteri Rhizosphere Tanaman Kedelai (*Glycine max* L.) di Trenggalek. *LenteraBio*, 11(1) : 144-152.
- Froese, R. & Pauly, D. (2008). FishBase. *Trichiurus lepturus* Linnaeus, 1758. Diakses pada 02 Maret 2022 dari <https://www.fishbase.in/Summary/SpeciesSummary.php?id=1288&lang=bahasa/>
- Gassem, M.A. (2017) Microbiological and Chemical Quality of a Traditional Salted-Fermented Fish (*Hout-Kasef*) Product of Jazan Region, Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(1): 137-140.
- Herliana, E. T. (2015). Preserving Javanese Culture through Retail Activities in Pasar Beringharjo, Yogyakarta. *Procedia - Social and Behavioral Sciences*, 184, 206 – 213.
- Holt, J.G., *et al.* (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9<sup>th</sup> Edition)*. USA : America Sans Tache.
- Hozzein, W.N. (2015). Biodiversity of Halophilic and Halotolerant Actinobacteria. Dalam Maheshwari, D.K. & Saraf, M. (Eds.), *Halophiles Biodiversity and Sustainable Exploitation* (pp.173-188). Switzerland : Springer International Publishing.
- Kementerian Kelautan dan Perikanan Indonesia. (2022). Statistik Produksi Perikanan Indonesia. Diakses pada 03 Maret 2022 dari [https://statistik.kkp.go.id/home.php?m=total\\_ikan&i=2#panel-footer](https://statistik.kkp.go.id/home.php?m=total_ikan&i=2#panel-footer)
- Kothe, C. I., *et al.* 2021. Unraveling The World of Halophilic and Halotolerant Bacteria in Cheese by Combining Cultural, Genomic and Metagenomic Approaches. *International Journal of Food Microbiology*, 358: 1-12.
- Kumar, S., *et.al.* (2012). Screening And Isolation Of Halophilic Bacteria Producing Industrially Important Enzymes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4),1595-1603.
- Leboffe, M.J., & Pierce, B.E. (2016). *Microbiology : Laboratory Theory & Application (Brief 3<sup>rd</sup> Edition)*. UK: Morton Publishing Company.
- Liu, J., Lin, C., & Zhang, W., *et.al.* (2021). Exploring the bacterial community for starters in traditional high-salt fermented Chinese fish (*Suanyu*). *Food Chemistry*, 358: 129863.
- Mellado, E.C., Sánchez-Porro, Martín, S., & Ventosa A. (2004). Extracellular Hydrolytic Enzymes Produced by Moderately Halophilic Bacteria. Dalam Ventosa, A. (Eds.), *Halophilic Microorganisms* (pp. 285-293). New York : Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Mohammadipannah, F., Hamed, J., & Dehghani, M. (2015). Halophilic Bacteria: Potentials and Applications in Biotechnology. Dalam Maheshwari, D.K. & Saraf, M. (Eds.), *Halophiles Biodiversity and Sustainable Exploitation* (pp.277-322). Switzerland : Springer International Publishing.
- Mokashe, N., Chaudhari, B., & Patil, U. (2017). Operative utility of salt-stable proteases of halophilic and halotolerant bacteria in the biotechnology sector. *International Journal of Biological Macromolecules*, 117: 493-522.
- Munifah, I. (2014). Isolasi, Seleksi Dan Identifikasi Bakteri Proteolitik Serta Produksi Protease Dari Terasi Cirebon. *Prosiding Seminar Nasional Inovasi Teknologi Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, Indonesia, 5, 87-96.
- Munn, C.B. (2019). *Marine Microbiology: Ecology & Applications (3<sup>rd</sup> Edition)*. New York: CRC-PRESS.
- Pelczar, M. J., & Chan, E.C.S. (2015). *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. (Terjemahan Hadioetomo, dkk.). Jakarta: UI-Press. (Edisi asli diterbitkan tahun 1981 oleh McGraw-Hill Book Company).

- Rahmawaty, D., Patanda, M., & Syafrie, H. (2021). Potensi Sumber Daya Ikan Layur (*Trichiurus lepturus*) di Perairan Palabuhanratu, Sukabumi. *Jurnal Ilmiah Satya Minabahari*, 6(2), 71-77.
- Rajendran, N. (2015). Environmental Diversity and Biological Survivability of Halophilic Bacteria. Dalam Maheshwari, D.K. & Saraf, M. (Eds.), *Halophiles Biodiversity and Sustainable Exploitation* (pp.173-188). Switzerland : Springer International Publishing.
- Rathakrishnan, D., & Gopalan, A. K., 2022. Isolation and characterization of halophilic isolates from Indian salterns and their screening for production of hydrolytic enzymes. *Journal of Enviromental Challanges*. 6, 2-10.
- Ramadhan, P. (2015). *Mikrobiologi Industri*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Raval,H.V., Purohit, M. K., & Singh, S. P. (2015). Extracellular Proteases from Halophilic and Haloalkaliphilic Bacteria: Occurrence and Biochemical Properties. Dalam Maheshwari, D.K. & Saraf, M. (Eds.), *Halophiles Biodiversity and Sustainable Exploitation* (pp.421-450). Switzerland : Springer International Publishing.
- Riski,K., Fakhurrrazi, & Abrar, M. (2017). Isolasi Bakteri *Staphylococcus aureus* Pada Ikan Asin Talang-Talang (*Scomberoides commersonnianus*) Di Kecamatan Leupung Kabupaten Aceh Besar. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Veteriner*, 1(3), 366-374.
- Rizaldi, R., Setyantini, W.H., & Sudarno, S. (2018). Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Proteolitik yang Berasosiasi dengan Lamun (*Enhalus acoroides*) di Pantai Bama, Taman Nasional Baluran, Situbondo, Jawa Timur. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 10(1), 8-14.
- Rohban, R., Amoozegar, M.A., & Ventosa, A. (2009). Screening And Isolation Of Halophilic Bacteria Producing Extracellular Hydrolyses From Howz Soltan Lake, Iran. *Journal of Industrial Microbiolohy Biotechnology*,36(3),333–340.
- Samad, N. S. A., *et al.* (2017). Isolation And Identification Of Halophilic Bacteria Producing Halotolerant Protease. *Science Heritage Journal*, 1(1), 7-9.
- Sanchez, S. & Demain, A.L. (2017). Useful Microbial Enzymes- An Introduction. Dalam Brahmachari, G. (Eds.), *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Application* (pp. 1-12). Netherlands: Elsevier Inc..
- Sari, A.M. (2013). *Seleksi, Karakterisasi, dan Identifikasi Bakteri Termofilik Lipolitik Hasil Isolasi Dari Gunung Merapi Pasca Erupsi*. Skripsi. Universitas Negeri Yogyakarta, Yogyakarta.
- Savitri, S.D.N. (2006). Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Halotoleran Pada Peda Ikan Kembung (*Rastrelliger sp.*). Skripsi, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Silvina, P., Marinaa, C., & Laurac, P.M., *et.al.* (2018). Monitoring the characteristics of cultivable halophilic microbial community during salted-ripened anchovy (*Engraulis anchoita*) production. *International Journal of Food Microbiology*, 286: 179-189.
- Susanti, R. & Fibriana, F. (2017). *Teknologi Enzim*. Yogyakarta: Andi Offset.
- Tatang, S., & Wardah. (2014). *Mikrobiologi Pangan: Teori dan Praktek*. Yogyakarta: Andi.
- Udomsil, N., Rodtong, S., Tanasupawat S., & Yongsawatdigul, J. (2010). Proteinase-Producing Halophilic Lactic Acid Bacteria Isolated From Fish Sauce Fermentation and Their Ability to Produce Volatile Compounds. *International Journal of Food Microbiology*,141: 186–194.
- Widarnani, Wahjuningrum, D. (2018). *Dasar-Dasar Mikrobiologi Akuatik dalam Praktik*. Bogor: IPB Press.
- Wulandari, S. W., Lessy, N. S., & Supriyatin, E. (2019). Uji Kuantitatif Kandungan Formalin pada Bahan Pangan Mentah di Pasar Tradisional Kota Yogyakarta, *Bioma*, 8(1): 315-323.