

## ISOLASI, PEMURNIAN, DAN KARAKTERISASI ENZIM $\alpha$ -AMILASE DARI *Bacillus subtilis* ITBCCB148

Yandri, Fathaniah Sejati,  
Tati Suhartati, Heri Satria, dan Sutopo Hadi  
Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Lampung,  
Bandar Lampung 35145 Indonesia  
E-mail: yandri.as@fmipa.unila.ac.id

### Abstrak

Penelitian ini bertujuan mengisolasi dan memurnikan serta mengkarakterisasi enzim  $\alpha$ -amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148. Isolasi enzim dilakukan menggunakan sentrifuga dingin untuk memisahkan enzim dari campuran sel. Pemurnian enzim dilakukan dengan fraksinasi menggunakan ammonium sulfat dan dialisis. Enzim  $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dilakukan karakterisasi meliputi: penentuan suhu optimum, penentuan konsentrasi substrat dan stabilitas termal. Aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase ditentukan dengan metode Fuwa dan Mandels sedangkan penentuan kadar protein dengan metode Lowry.

Hasil penelitian menunjukkan aktivitas spesifik enzim hasil pemurnian 7532 U/mg, meningkat 5,9 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim yang memiliki aktivitas spesifik 1285 U/mg. Enzim hasil pemurnian memiliki suhu optimum 65°C, nilai  $K_M$  7,543 mg mL<sup>-1</sup> substrat, dan nilai  $V_{max}$  = 147,058  $\mu$ mol mL<sup>-1</sup> menit<sup>-1</sup>. Uji stabilitas termal enzim hasil pemurnian selama 100 menit pada suhu 65°C menunjukkan aktivitas sisa sebesar 20%.

**Kata kunci:**  $\alpha$ -amilase, *Bacillus subtilis* ITBCCB148, karakterisasi

## ISOLATION, PURIFICATION, AND CHARACTERIZATION OF $\alpha$ -AMILASE ENZYME FROM *Bacillus subtilis* ITBCCB148

Yandri, Fathaniah Sejati,  
Tati Suhartati, Heri Satria, and Sutopo Hadi  
Departement of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences University of  
Lampung, Bandar Lampung 35145 Indonesia  
E-mail: yandri.as@fmipa.unila.ac.id

### Abstract

This study aims to isolate, purify and characterize the  $\alpha$ -amylase enzyme from *Bacillus subtilis* ITBCCB148. Isolation of the enzyme was conducted using cold centrifuge to separate the enzyme from the cell mixture. The purification of enzyme was done by using



ammonium sulfate fractionation followed by dialysis. Furthermore, the purified enzyme was characterized for some parameters including optimum temperature, substrate concentration and thermal stability. The  $\alpha$ -amylase enzyme activity was determined by the Mandels and Fuwa methods and protein content was determined by Lowry method.

The results showed that the purified enzyme has specific activity at  $7532 \text{ U mg}^{-1}$ , it was increase of 5.9 times compared to the crude extract which has a specific activity of  $1285 \text{ U mg}^{-1}$ . The temperature optimum of the purified enzyme was  $65^\circ \text{C}$ , the  $K_M$  and  $V_{max}$  values were  $7.543 \text{ mg mL}^{-1}$  substrate, and  $147.058 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ minute}^{-1}$ . Thermal stability of the purified enzyme for 100 minutes at  $65^\circ \text{C}$  remained the residual activity of 20%.

**Keywords:**  $\alpha$ -amilase, *Bacillus subtilis* ITBCCB148, characterization

## 1. PENDAHULUAN

Enzim amilase merupakan enzim yang dapat mengkatalisis penguraian pati, glikogen, dan berbagai oligosakarida secara acak. Enzim ini dibagi dalam empat golongan (Horvathova *et al.*, 2000), yaitu: (1) Ekso amilase, adalah enzim yang memutuskan ikatan  $\alpha$ -1,4 glikosida pada bagian luar molekul. Salah satu enzim yang termasuk dalam golongan ini adalah  $\beta$ -amilase (EC 3.2.1.2). (2) Glukoamilase (EC 3.2.1.3) adalah enzim yang mengkatalisis pemutusan ikatan  $\alpha$ -1,4 dan ikatan  $\alpha$ -1,6 glikosida dari bagian luar molekul. (3) *Debranching* enzim adalah enzim yang spesifik dalam memutuskan ikatan  $\alpha$ -1,6 glikosida dalam pati (amilopektin). Enzim yang termasuk golongan ini adalah pululanase (EC 3.2.1.41) dan isoamilase (EC 3.2.1.68). (4) Endo amilase adalah enzim yang mengkatalisis penguraian pati dari bagian tengah atau bagian dalam molekul (Fogarty dan Kelly, 1979). Enzim yang termasuk golongan ini adalah  $\alpha$ -amilase. Enzim ini dihasilkan oleh beberapa mikroorganisme secara ekstraseluler misalnya *Aspergillus oryzae*, *A. niger*, *A. awamori*, *Bacillus mesentericus*, *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, dan *B. licheniformis*. Enzim  $\alpha$ -amilase yang dihasilkan *B. subtilis* mempunyai pH optimum 6,0; dan stabil pada pH antara 5,5-9,5. Suhu optimum enzim ini  $60^\circ \text{C}$ . Enzim  $\alpha$ -amilase yang dihasilkan *B. stearothermophilus* mempunyai pH optimum 4,6-5,1; suhu optimum  $55\text{-}70^\circ \text{C}$ . Sedangkan enzim  $\alpha$ -amilase yang dihasilkan *B. licheniformis* mempunyai pH optimum 5,0-8,0; stabil pada pH antara 6,0-11,0; dan suhu optimumnya  $76^\circ \text{C}$ . Umumnya enzim  $\alpha$ -amilase mempunyai bobot molekul sekitar 50 kDa. (Fogarty dan Kelly, 1979). Sedangkan menurut Janecek dan Balaz (1992), bobot molekul enzim  $\alpha$ -amilase berkisar antara 45 – 60 kDa. Ohdan *et al.* (1999), berhasil mengkarakterisasi dua jenis enzim  $\alpha$ -amilase dari *B. subtilis*



X-23. Hasil penelitiannya menunjukkan enzim  $\alpha$ -amilase yang berhasil dimurnikan mempunyai bobot molekul 47 dan 67 kDa. Sedangkan pH optimum kedua enzim sama, yaitu 5,5; dan kedua enzim tersebut stabil antara pH 5,5 – 10.

Semua  $\alpha$ -amilase adalah metaloenzim yang mengandung sedikitnya satu ion  $\text{Ca}^{2+}$  tiap molekul enzim. Ion kalsium ini penting untuk aktivitas dan stabilitas enzim. Ion kalsium dalam enzim Taka amilase A dari *A. oryzae* berada dekat celah antara dua domain strukturalnya, kemungkinan berperan dalam penstabilan bentuk celah (Vihinen dan Mantsala, 1989). Keadaan yang sama diidentifikasi dalam  $\alpha$ -amilase pankreas babi yang menunjukkan ion kalsium menstabilkan celah dengan induksi jembatan ionik di antara domain (Buisson *et al.*, 1987). Afinitas ion kalsium pada  $\alpha$ -amilase lebih kuat dari kation-kation lain. Masih belum jelas apakah ion kalsium dapat diganti oleh kation-kation lain (Vihinen dan Mantsala, 1989).

Banyak sumber utama  $\alpha$ -amilase telah diakui sebagai kelompok mikroorganisme yang berbeda, terutama bakteri dan jamur yang mengarah ke penggunaan dalam industri. Ini telah dipelajari secara luas karena peningkatan relatif dalam aplikasi skala besar (Simair, *et al.*, 2017). Bakterial  $\alpha$ -amilase memiliki sifat-sifat baru, telah menjadi cakupan utama penelitian terbaru (Trabelsi *et al.*, 2019). *Bacillus subtilis* adalah bakteri gram positif berbentuk batang, dapat membentuk endospore, untuk bertahan di lingkungan ekologi berbahaya dari radiasi, pelarut, suhu dan pH ekstrim (Yu *et al.*, 2014). Amilase enzim pendegradasi pati, adalah enzim penting yang digunakan dalam industri dan menyumbang proporsi tinggi dari pasar enzim (Singh *et al.*, 2016).

Pada penelitian ini telah dilakukan karakterisasi pada enzim  $\alpha$ -amilase hasil pemurnian dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 meliputi penentuan suhu optimum, konsentrasi substrat dan stabilitas termal.



## 2. BAHAN DAN METODE

### 2.1 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah yang mempunyai derajat proanalisis, *Bacillus subtilis* ITBCCB148 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi dan Teknologi Bioproses Jurusan Teknik Kimia Institut Teknologi Bandung.

### 2.2 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas, mikropipet Eppendroff, autoklaf model S-90N, *laminar air flow* CRUMA model 9005-FL, sentrifuga WIFUG LABOR-50M, *shaker waterbath incubator* GFL1092, Magnetic Stirrer STUART CB 161, incubator *PRECISTERM*, penangas *PRECISTERM*, *waterbath incubator* HAAKE dan spektrofotometer UV-VIS Cary Win UV 32.

### 2.3 Prosedur Penelitian

#### 2.3.1 Produksi enzim $\alpha$ -amilase

Enzim  $\alpha$ -amilase diproduksi pada media fermentasi yang mengandung: pati 0,5%; ekstrak ragi 0,5%;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,05%; dan  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,01% dengan pH 6,5. Suhu fermentasi 32°C; dan lama waktu fermentasi 72 jam (Yandri *et al.*, 2010).

#### 2.3.2 Isolasi enzim $\alpha$ -amilase

Enzim  $\alpha$ -Amilase dalam media fermentasi dipisahkan dari sel bakteri lokal *Bacillus subtilis* ITBCCB148 dengan sentrifuga dingin pada laju 6000 rpm selama 30 menit sehingga diperoleh ekstrak kasar enzim (Yandri *et al.*, 2010).

#### 2.3.3 Pemurnian enzim selulase

Pemurnian dilakukan dengan cara fraksinasi menggunakan garam ammonium sulfat dengan berbagai derajat kejenuhan dan dilakukan dialisis (Yandri *et al.*, 2010; Bolag *et al.*, 1996).

#### 2.3.4 Uji aktivitas dan penentuan kadar protein enzim

Uji aktivitas  $\alpha$ -amilase menggunakan metode Fuwa (Fuwa, 1954) dan pereaksi asam dinitrosalisilat (Mandels *et al.*, 1976). Kadar protein enzim ditentukan dengan metode Lowry *et al.*, (1951).

### 2.3.5 Penentuan suhu optimum

Penentuan suhu optimum enzim  $\alpha$ -amilase ditentukan dengan memvariasikan suhu, yaitu 55; 60; 65; 70; 75; 80; dan 85. Selanjutnya dilakukan pengukuran aktivitas enzim dengan metode Mandels.

### 2.3.6 Penentuan $K_M$ dan $V_{maks}$

Nilai Michaelis-Menten ( $K_M$ ) dan laju reaksi maksimum ( $V_{maks}$ ) enzim dilakukan dengan memvariasikan konsentrasi substrat (larutan pati) yaitu 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 dan 1,0 %.

### 2.3.7 Uji stabilitas termal enzim (Yang *et al.*, 1996)

Stabilitas termal enzim dilakukan dengan cara mengukur aktivitas sisa enzim setelah diinkubasi selama 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 dan 100 menit.

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 3.1 Isolasi Enzim

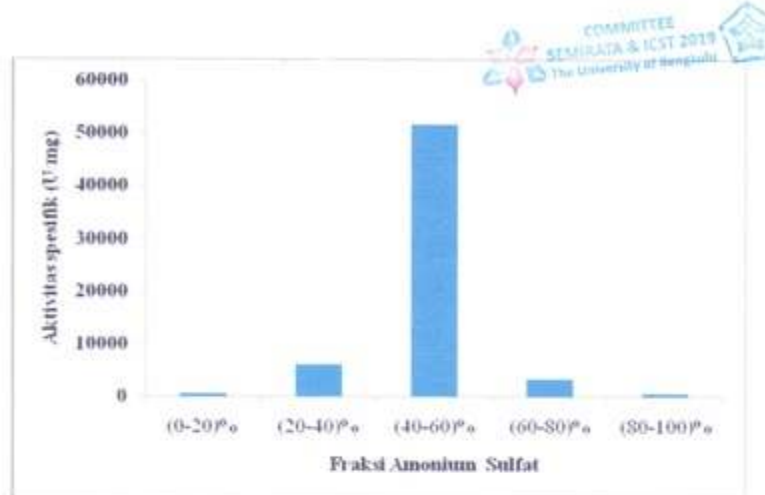
Ekstrak kasar enzim  $\alpha$ -amilase dalam media fermentasi dipisahkan dari komponen sel lainnya melalui sentrifugasi dingin dengan kecepatan 6000 rpm selama 30 menit. Ekstrak kasar enzim  $\alpha$ -amilase yang diperoleh memiliki aktivitas unit dan aktivitas spesifik berturut-turut yaitu 291 U/mL dan 1285 U/mg.

### 3.2 Pemurnian Enzim $\alpha$ -Amilase

Ekstrak kasar Enzim  $\alpha$ -Amilase yang diperoleh kemudian dimurnikan. Pemurnian enzim yang dilakukan pada penelitian ini meliputi tahap fraksinasi dengan ammonium sulfat, dan dialisis.

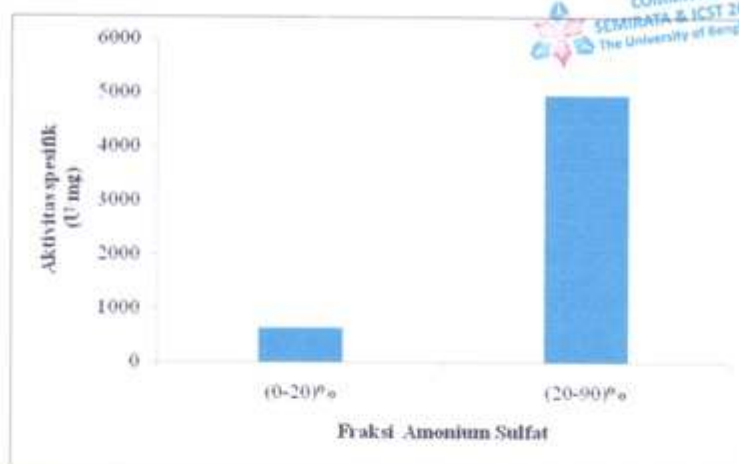
#### 3.2.1 Fraksinasi dengan ammonium sulfat

Pada tahap ini proses pemurnian dilakukan dengan cara menambahkan ammonium sulfat dalam lima tingkat fraksi, yaitu (0-20)%, (20-40%), (40-60)%, (60-80)%, dan (80-100)%. Gambar 1. menunjukkan hubungan antara tingkat kejenuhan ammonium sulfat dengan aktivitas spesifik enzim  $\alpha$ -amilase.



**Gambar 1.** Hubungan antara berbagai tingkat kejenuhan ammonium sulfat dengan aktivitas spesifik enzim  $\alpha$ -amilase

Dari gambar di atas diketahui bahwa aktivitas spesifik enzim  $\alpha$ -amilase tertinggi berada pada fraksi 40-60%, yaitu sebesar 51.920,736 U/mg. Namun, pada beberapa fraksi enzim seperti fraksi 20-40%, 60-80% dan 80-100% masih terdapat aktivitas spesifik yang cukup besar yaitu 6167,696 U/mg, 3350,864 U/mg, dan 633,315 U/mg. Hal ini menunjukkan bahwa masih terdapat banyak enzim yang terendapkan pada fraksi-fraksi tersebut. Sehingga untuk proses fraksinasi menggunakan ammonium sulfat berikutnya hanya dibagi menjadi dua fraksi yaitu 0-20% dan 20-90%. Pembagian fraksi tersebut bertujuan untuk meningkatkan perolehan dan aktivitas enzim serta menghindari kehilangan protein enzim yang cukup besar selama proses fraksinasi. Fraksi 0-20% tidak digunakan untuk proses pemurnian selanjutnya karena jumlah enzim yang terendapkan sangat sedikit sehingga aktivitas spesifik enzim pada fraksi ini pun sangat kecil yaitu 648,2 U/mg. Sedangkan aktivitas spesifik pada fraksi 20-90% yaitu sebesar 4991 U/mg. Hasil tersebut menunjukkan bahwa aktivitas spesifik enzim hasil fraksinasi mengalami peningkatan kemudian dibandingkan ekstrak kasar enzim yaitu sebesar 3,9 kali dengan perolehan enzim sebesar 68%. Adapun aktivitas spesifik pola fraksinasi (0-20)% dan (20-90)% dapat dilihat pada Gambar 2.



**Gambar 2 .** Hubungan antara tingkat kejenuhan ammonium sulfat fraksi (0-20)% dan (20-90)% dengan aktivitas spesifik enzim  $\alpha$ -amilase

### 3.2.2 Dialisis

Dialisis merupakan suatu metode yang digunakan untuk memisahkan larutan protein dari garam. Metode ini didasarkan pada sifat semipermeabel membran (kantong selofan) yang dapat menahan molekul-molekul besar, tapi dapat meloloskan molekul-molekul kecil seperti garam. Sehingga protein enzim akan terpisahkan dari garam-garam dan ion-ion lain, yang pada akhirnya akan diperoleh enzim dengan kemurnian yang lebih tinggi. Pada penelitian ini didapatkan bahwa enzim  $\alpha$ -amilase hasil dialisis memiliki aktivitas spesifik sebesar 7532 U/mg. Hasil tersebut menunjukkan bahwa aktivitas spesifik enzim hasil dialisis mengalami peningkatan kemurnian dibandingkan ekstrak kasar enzim yaitu sebesar 5,9 kali dengan perolehan enzim sebesar 49%. Tabel 1. menunjukkan ringkasan pemurnian enzim  $\alpha$ -amilase dari *B. subtilis* ITBCCB148.

Tabel 1. Pemurnian enzim  $\alpha$ -amilase dari *B. subtilis* ITBCCB148



Tahap	Volume Enzim (mL)	Aktivitas Unit (U/mL)	Aktivitas Total (U)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Tingkat Kemurnian (kali)	perolehan (%)
Ekstrak Kasar	3000	291	873000	0,2265	1285	1	100
Hasil Fraksi (20-90%) ammonium sulfat	150	3943	591450	0,790	4991	3,9	68
Hasil Dialisis	300	1416	424800	0,188	7532	5,9	49

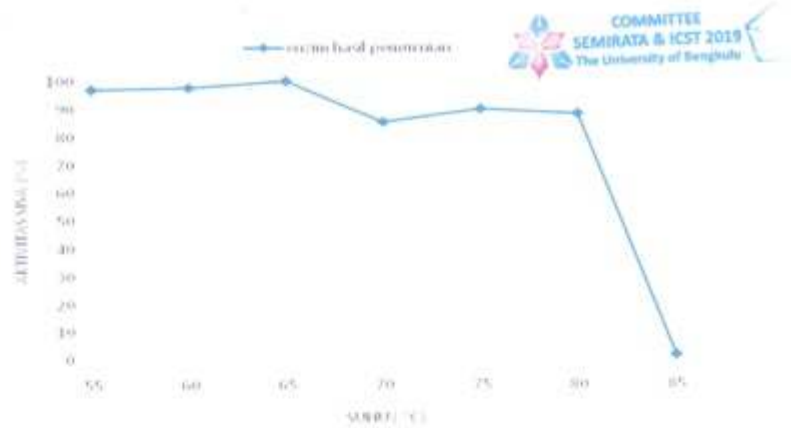
Data pada Tabel 1 di atas menunjukkan enzim  $\alpha$ -amilase mengalami peningkatan aktivitas spesifik setiap tahap pemurnian. Hal ini didukung oleh penurunan kadar protein dan perolehan (%) enzim yang menunjukkan bahwa enzim telah terpisahkan dari protein lainnya. Hasil ini juga menunjukkan perolehan enzim hasil pemurnian (hasil dialisis) tidak terlalu besar yaitu 49%, hal ini mungkin disebabkan tidak semua enzim  $\alpha$ -amilase terendapkan oleh garam amonium sulfat atau kemungkinan lain enzim kehilangan aktivitas selama proses karena larutan enzim yang sangat encer.

### 3.3 . Karakterisasi Enzim Hasil Pemurnian

#### 3.3.1. Penentuan suhu optimum

Penentuan suhu optimum enzim  $\alpha$ -amilase ditentukan dengan menginkubasi enzim pada berbagai suhu inkubasi 55, 60, 65, 70, 75, 80, dan 85°C. Aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase dari *Bacillus subtilis* ITBCCB148 hasil pemurnian pada berbagai suhu dapat dilihat pada Gambar 3. Pada gambar tersebut dapat dilihat bahwa suhu optimum enzim hasil pemurnian adalah 65°C. Enzim ini termasuk golongan enzim yang bersifat temostabil yaitu enzim yang dapat bekerja pada rentang suhu antara 60 - 125 °C (Vieille dan Zeikus, 1996; Vieille dan Zeikus, 2001). Gambar 3 juga menunjukkan enzim hasil pemurnian cukup stabil antara suhu 55 – 80 °C dan memenuhi syarat untuk digunakan dalam industri.

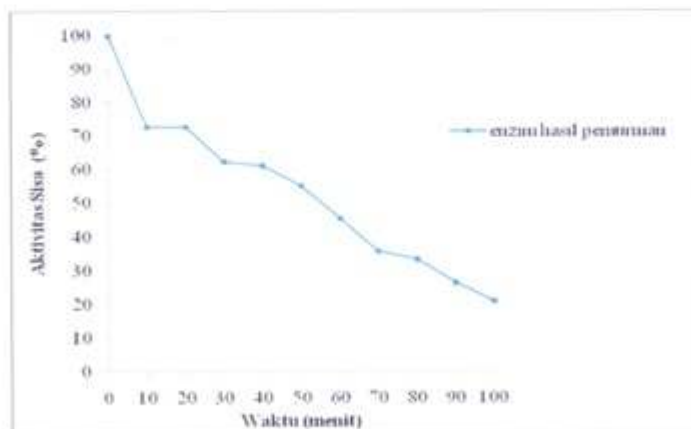




**Gambar 3.** Suhu optimum enzim hasil pematangan

### 3.3.2 Penentuan stabilitas termal enzim hasil pematangan

Penentuan stabilitas termal enzim ditentukan dengan menginkubasi enzim pada berbagai waktu inkubasi yaitu 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, dan 100 menit. Gambar 4 menunjukkan enzim hasil pematangan mempunyai aktivitas sisa (%) setelah diinkubasi selama 100 menit sebesar 20%. Perlu peningkatan stabilitas enzim agar dapat digunakan dalam industri.

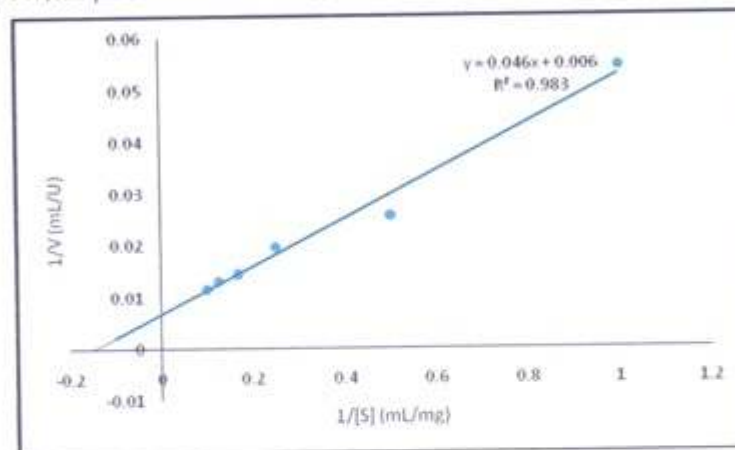


**Gambar 4.** Hubungan antara stabilitas termal enzim hasil pematangan pada suhu 65°C terhadap waktu.

### 3.3.3 Penentuan $K_M$ dan $V_{maks}$ enzim hasil pemurnian



Penentuan harga  $K_M$  dan  $V_{maks}$  dilakukan dengan memvariasikan konsentrasi substrat terhadap enzim. Konsentrasi substrat yang digunakan adalah 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1,0%. Grafik penentuan harga  $K_M$  dan  $V_{maks}$  enzim hasil pemurnian dapat dilihat pada Gambar 5. Dari persamaan *Lineweaver-Burk* diperoleh nilai  $V_{maks}$  enzim hasil pemurnian sebesar 147,058  $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$  dan  $K_M$  sebesar 7,543 mg/mL.



Gambar 5. Grafik *Lineweaver-Burk* untuk enzim hasil pemurnian

### KESIMPULAN

Aktivitas spesifik enzim  $\alpha$ -amilase hasil pemurnian meningkat sebesar 5,9 kali dibandingkan ekstrak kasar enzim yaitu sebesar 1285 U/mg menjadi 7532 U/mg. Enzim  $\alpha$ -amilase hasil pemurnian memiliki suhu optimum 65°C. Uji stabilitas enzim hasil pemurnian pada suhu 65°C selama 100 menit masih memiliki aktivitas sebesar 20%. Enzim  $\alpha$ -amilase hasil pemurnian memiliki  $K_M = 7,543 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $V_{maks} = 147,058 \mu\text{mol mL}^{-1}\text{menit}^{-1}$ .

### UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih kepada Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi, Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan, Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat, atas dukungan dana dalam bentuk Penelitian Dasar dengan nomor kontrak : 065/SP2H/LT/DRPM/2019.



## DAFTAR PUSTAKA

Bollag, D. M., M. D. Rozycki, S. J. Edelstein (1996). *Protein Methods* 2<sup>nd</sup> ed., John Wiley & Sons, Inc., Publication, New York.

Buisson, G., E. Duee, R. Haser, and F. Payan (1987), Three dimensional structure of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase at 2.9 Å resolution. role of calcium in structure and activity, *EMBO J.*, **6**, 3909-3916.

Fogarty, W.M. and C.T. Kelly (1979), *Enzyme and Fermentation Biotechnology*, Ellis Horwood Limited, West Sussex, England, 45-52.

Fuwa, H. (1954), A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate, *J. Biochem. (Tokyo)*, **41**, 583-603.

Horvathova, V. S. Janecek, and E. Sturdik (2000), Amylolytic enzymes: Their specificities, origins, and properties, *Biologia. Bratislava*, **55**:6, 605-615.

Janecek, S. and S. Balaz (1992),  $\alpha$ -Amylase and approaches leading to their enhanced stability, *Febs Lett.*, **304** (1), 1-3.

Lowry, O.H., N.J., Rosebrough, A.L., Farr, R.J. Randall (1951), Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193-265.

Mandels, M., A. Raymond , R. Charles (1976), Measurement of saccharifying cellulase, *Biotech. & Bioeng. Symp.*, No. 6, John Wiley & Sons Inc.

Ohdan, K., T. Kuriki, H. Kaneko, J. Shimada, T. Takada, Z. Fujimoto, H. Mizuno, and S. Okada (1999), Characteristics of two forms of  $\alpha$ -amylases and structural implication, *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**/10, 4652-4658.

Simair, A. A., Qureshi, A. S., Khushk, I., Ali, C. H., Lashari, S., Bhutto, M. A., & Lu, C. (2017), Production and partial characterization of  $\alpha$ -amylase enzyme from bacillus sp. bcc 01-50 and potential applications. *BioMed research international* pp 1-9.

Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P.K. (2016), Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *Biotech* **6** 2 174

Trabelsi S, Mabrouk S B, Kriaa M, Ameri R, Sahnoun M, Mezghani M, Bejar S (2019), The optimized production, purification, characterization, and application in the bread making industry of three acid-stable alpha-amylases isoforms from a new isolated *Bacillus*



*subtilis* strain US586. *J Food Biochem.* e12826.

Vieille, C. and J. G. Zeikus (1996), Thermozyymes: Identifying molecular determinant of protein structural and functional stability, *Tibtech.*, **14** (6), 183-189.

Vieille, C. and G. J. Zeikus (2001), Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **65** (1), 1-43.

Vihinen, M. and P. Mantsala (1989), Site-directed Mutagenesis of a Thermostabile  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus stearothermophilus*: Putative Role of Three Conserved Residues, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **24**, 329-418.

Yandri, A.S., T. Suhartati, and S. Hadi. 2010. Purification and characterization of extracellular  $\alpha$ -amilase enzyme from locale bacteria isolate *Bacillus subtilis*ITBCCB148. *Eur. J. Sci. Res.* **39** (1): 64-74.

Yang, Z., D. Michael, A. Robert, X.Y. Fang, and J.R. Alan (1996), Polyethylene glycol-induced stabilization of subtilisin, *Enzyme Microb. Technol.*, **18**, 82-89.

Yu, AC, Loo JF, Yu S, Kong SK, Chan TF. (2014) Monitoring bacterial growth using tunable resistive pulse sensing with a pore-based technique. *Applied Microbiology and Biotechnology.* **98** (2): 855-62.