

The Effect of Sugar Variation and Fermentation Time on Hydrogen Peroxide Levels and Eco-Enzyme Antibacterial Activity

Ni Putu Vidya Primarista^{1*}, Abdul Rohman Wali¹, Trisuciati Syahwardini¹

¹D-III Teknik Kimia PSDKU Siak, Politeknik Negeri Sriwijaya, Palembang, Indonesia;

Article History

Received : December 20th, 2025

Revised : January 05th, 2026

Accepted : January 10th, 2026

*Corresponding Author: Ni

Putu Vidya Primarista,

D-III Teknik Kimia PSDKU

Siak, Politeknik Negeri

Sriwijaya, Palembang,

Indonesia;

Email:

vidyaprimarista@polsri.ac.id

Abstract: Eco-enzyme is a filtrate resulting from the fermentation of sugar, organic materials, and water, which is produced not only to reduce organic waste but also as a functional product. This study aims to examine the effects of sugar type and the eco-enzyme's fermentation duration on three key parameters: bacterial optical density, hydrogen peroxide concentration, and inhibition zone against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The bacterial optical density was determined from absorbance measured at 600 nm using a UV-Vis spectrophotometer, the hydrogen peroxide concentration was determined by permanganometric titration, and the inhibition zone of the eco-enzyme against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* was determined using the disc diffusion method. The results showed that the eco-enzyme fermented with molasses for one month had the highest bacterial optical density. Meanwhile, the highest hydrogen peroxide concentration was found in the eco-enzyme fermented with molasses for three months. In addition, the eco-enzyme fermented with molasses for three months exhibited the highest antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, with inhibition zones of 6.59 mm and 6.37 mm, respectively. Eco-enzymes fermented with granulated sugar, palm sugar, and molasses all showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. However, the highest antibacterial activity against both bacteria was observed in the eco-enzyme fermented with molasses for three months.

Keywords: Antibacterial activity, eco-enzyme, fermentation duration, hydrogen peroxide, sugar.

Pendahuluan

Pengelolaan sampah organik merupakan isu lingkungan yang terus berkembang seiring meningkatnya aktivitas manusia di berbagai sektor, baik rumah tangga, pertanian, maupun industri makanan. Data dari Kementerian Lingkungan Hidup menunjukkan bahwa terdapat timbulan sampah sebanyak 38.615.598,96 ton sepanjang tahun 2024, yang didominasi dari sisa makanan (38,3%) dan bersumber dari rumah tangga (46,84%) (Kementerian Lingkungan Hidup dan Kehutanan, 2025). Sampah organik jika tidak dikelola dengan baik dapat menimbulkan pencemaran lingkungan, bau tidak sedap, dan menjadi sumber berkembangnya

mikroorganisme patogen. Sebagai solusi terhadap permasalahan tersebut, berbagai pendekatan berbasis bioteknologi ramah lingkungan mulai dikembangkan, seperti *eco-enzyme*. *Eco-enzyme* adalah filtrat hasil fermentasi limbah organik dengan gula dan air. Pemanfaatan limbah organik menjadi *eco-enzyme* tidak hanya berkontribusi terhadap pengurangan jumlah sampah, tetapi juga menghasilkan produk fungsional yang memiliki potensi ekologis dan ekonomis.

Selama fermentasi berlangsung, aktivitas mikroba menghasilkan berbagai senyawa bioaktif (Primarista *et al.*, 2023). Keberadaan senyawa-senyawa ini diyakini menjadi dasar dari berbagai potensi aplikasi *eco-enzyme*, mulai dari pembersih alami,

pengendalian hama organik, hingga agen antimikroba. Proses fermentasi organik melibatkan aktivitas enzimatis dan metabolisme mikroorganisme, seperti *Lactobacillus*, *Saccharomyces*, dan kelompok bakteri asam laktat lainnya, yang menghasilkan asam-asam organik dan senyawa oksidatif (Suriani *et al.*, 2023; Novianti *et al.*, 2025). Hidrogen peroksida yang terbentuk selama fermentasi merupakan komponen penting karena bersifat oksidator kuat yang mampu merusak membran sel bakteri (Valverde *et al.*, 2018). Sementara itu, asam organik menurunkan pH sehingga menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang tidak tahan terhadap kondisi asam (Novianti *et al.*, 2025; Ashokkumar *et al.*, 2024; Gattupalli *et al.*, 2024). Kombinasi ini memberikan sifat antibakteri pada eco-enzyme.

Penelitian-penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa variasi bahan organik dan kondisi fermentasi dapat menghasilkan eco-enzyme dengan karakteristik kimia dan biologi yang sangat berbeda. Penelitian dengan bahan dasar kulit jeruk menunjukkan aktivitas antibakteri kuat karena kandungan senyawa fenolik dan flavonoid yang tinggi, sedangkan eco-enzyme dari limbah buah tropis lain memiliki kadar asam yang berbeda dan efektivitas antimikroba yang bervariasi (Rasit *et al.*, 2019; Nalladiyil *et al.*, 2023). Namun, sejauh ini, masih sedikit penelitian yang secara spesifik menganalisis hubungan antara jenis gula dan lama fermentasi dengan parameter biokimia dan biologis seperti densitas optik pertumbuhan bakteri, kadar hidrogen peroksida, dan kemampuan antibakteri terhadap mikroba patogen seperti *Staphylococcus aureus* (bakteri Gram positif) dan *Escherichia coli* (bakteri Gram negatif).

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengeksplorasi pemanfaatan eco-enzyme di berbagai bidang. Dalam konteks rumah tangga dan pertanian, eco-enzyme digunakan sebagai pembersih alami dan pengusir serangga (Jelita, 2022; Sholihah & Pratama, 2025; Dewi *et al.*, 2025). Di bidang pertanian, eco-enzyme digunakan sebagai pupuk cair organik untuk meningkatkan kesuburan tanah (Harahap & Negara, 2025; Aminullah *et al.*, 2025; Heltina *et al.*, 2025; Simanjuntak *et al.*, 2025). Sementara itu, di

bidang lingkungan, eco-enzyme menunjukkan potensi sebagai agen bioremediasi karena kemampuannya menurunkan kadar amonia, nitrit, dan bahan kimia berbahaya lainnya dalam air limbah (Sari *et al.*, 2025; Widyasari & Wiratama, 2021). Selain itu, penelitian terbaru menunjukkan bahwa eco-enzyme juga memiliki aktivitas antimikroba terhadap beberapa bakteri patogen seperti *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, yang membuka peluang untuk pemanfaatannya dalam bidang kesehatan dan pengendalian mikroba (Dwijastuti *et al.*, 2025; Lubis *et al.*, 2025); (Mavani *et al.*, 2020); (Rahman *et al.*, 2021); (Bulai *et al.*, 2021).

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini mengkaji pengaruh jenis gula dan lama fermentasi eco-enzyme terhadap tiga parameter utama, yaitu: densitas optik bakteri sebagai indikator pertumbuhan mikroorganisme dalam proses fermentasi, kadar hidrogen peroksida sebagai produk oksidatif hasil fermentasi yang menjadi indikator aktivitas antibakteri potensial, dan zona hambat terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* sebagai parameter langsung efektivitas antimikroba. Ketiga parameter ini diharapkan dapat memberikan gambaran rinci tentang hubungan antara komposisi fermentasi dan potensi bioaktivitas eco-enzyme secara biokimiawi dan mikrobiologis.

Bahan dan Metode

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah wadah plastik, gelas ukur, tabung reaksi, cawan petri, erlenmeyer, pipet tetes, pipet ukur, pipet mikro, corong, buret mikro, kertas cakram, kertas saring whatman no 1, kertas cokelat, kapas steril, autoklaf, pengaduk magnetik, jarum ose, kasa steril, jangka sorong, termometer, vortex mixer (DLAB MX-S 2500rpm), inkubator (Memmert IN55), hot plate magnetic stirrer (JOANLAB SH-3), neraca analitik (SHIMADZU TW 223L), dan spektrofotometer UV-Vis double beam (SHIMADZU UV 1800).

Bahan pembuatan eco-enzyme adalah gula pasir, gula merah, molase, dan campuran kulit buah naga, jeruk, melon, semangka, jambu, dan apel, kultur bakteri *Staphylococcus aureus* dan

Escherichia coli, asam sulfat (Merck), kalium permanganat (Merck), natrium hipoklorit (Onemed), *nutrient agar* (Oxoid), dan *nutrient broth* (Himedia).

Penelitian ini juga diukur densitas optik untuk mengetahui densitas bakteri pada filtrat eco-enzyme. Terdapat 9 perlakuan pada eco-enzyme yang diuji, yaitu eco-enzyme terfermentasi dengan gula pasir, gula merah, dan molase dan masing-masing difermentasi selama 1, 2, dan 3 bulan. Pengaruh jenis bahan organik yang digunakan dalam pembuatan *eco-enzyme* tidak diteliti.

Pembuatan Eco-Enzyme

Pembuatan eco-enzyme dilakukan dengan variasi waktu panen 1, 2, dan 3 bulan. Disiapkan 3 wadah plastik dengan 1000 ml air dan dicampurkan secara berturut 100 g gula pasir, gula merah, dan molase di masing-masing wadah. Sebanyak 300 g bahan organik berupa kulit buah dimasukkan di setiap wadah dan dipanen setelah masa fermentasi 1, 2, dan 3 bulan. Filtrat sampel disaring dengan kertas saring whatman 1 dan disimpan dalam botol kaca untuk analisis selanjutnya (Hanifah et al., 2022).

Pengukuran Densitas Optik Bakteri

Pengukuran densitas optik diawali dengan pembuatan larutan standar McFarland 0,5. Sebanyak 0,05 ml larutan BaCl₂ 1% dan 9,95 ml larutan H₂SO₄ 1% dimasukkan kedalam tabung reaksi tutup ulir. Campuran divortex hingga homogen dan disimpan dalam kulkas. Secara berturut, absorbansi larutan McFarland 0,5 dan filtrat Eco-enzyme diukur dengan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm. Jika nilai absorbansi filtrat lebih besar dari larutan standar McFarland, maka filtrat diencerkan hingga nilai absorbansi antara 0,08 - 0,1 (Rosmania & Yanti, 2020).

Penentuan Kadar Hidrogen Peroksida

Sebanyak 10 mL filtrat sampel dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan 2 ml H₂SO₄ 4M. Larutan dipanaskan dengan *waterbath* sampai suhu $\pm 70^{\circ}\text{C}$, lalu larutan dititrasi dengan larutan KMnO₄ 0,025 M hingga larutan berwarna ungu selama kurang lebih 15 detik. Kadar hidrogen peroksida (H₂O₂) ditentukan dengan rumus (1) (Muawanah et al., 2020).

$$\text{H}_2\text{O}_2 = \left(\frac{V \text{ KMnO}_4 \times N \text{ KMnO}_4 \times \text{ME}}{V \text{ H}_2\text{SO}_4 \times V \text{ sampel}} \right) \times 10000$$

Keterangan:

V KMnO₄ = volume kalium permanganat (ml)

N KMnO₄ = normalitas kalium permanganat (N)

ME = factor ekuivalen (1,701/mg)

V H₂SO₄ = volume asam sulfat (ml)

Zona Hambat terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

Seluruh peralatan gelas dan media NA dan NB yang akan digunakan selama pengujian disterilkan dengan autoklaf. Peralatan yang akan disterilkan dibungkus dengan kertas. Sterilisasi dengan autoklaf dilakukan dengan suhu 121°C dan tekanan 15 psi selama 15 menit. Selanjutnya dilakukan pembiakan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Jarum ose dan mulut tabung reaksi, baik yang berisi biakan murni maupun media padat baru, dilewatkan pada nyala api spiritus untuk sterilisasi. Isolat diambil dengan menggunakan jarum ose, dan digoreskan secara zig-zag ke dalam tabung reaksi berisi media padat NA. Setelah itu, kedua tabung ditutup kembali dengan kapas steril dan kertas coklat. Tabung berisi biakan bakteri baru diinkubasi pada suhu 37°C selama jam 24 jam. Suspensi bakteri uji dibuat dengan memasukkan 2 mata ose kultur bakteri hasil peremajaan dari media padat secara aseptis ke dalam tabung reaksi yang berisi media cair steril NB. Mulut erlenmeyer dilewatkan pada nyala api spiritus, ditutup dengan kapas, kasa steril, dan kertas coklat. Selanjutnya, media cair yang berisi subkultur tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Pengujian aktivitas antibakteri menggunakan metode cakram dimana sebanyak 20 ml media NA steril dituang ke cawan petri dan ditunggu hingga media memadat. Selanjutnya bakteri biakan uji (*Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*) yang telah diremajakan disebarkan dengan kapas steril dari media cair ke cawan petri steril. Kertas cakram direndam selama 20 menit secara berturut dengan akuades sebagai kontrol negatif, larutan NaOCl 2,5% sebagai kontrol positif, dan larutan sampel. Kertas cakram yang telah direndam dipindahkan dengan pinset steril ke cawan petri secara aseptis, kemudian diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C. Aktivitas antibakteri berupa daya hambat diperoleh dari selisih diameter zona bening dan

diameter kertas cakram yang diukur dengan jangka sorong (Primarista et al., 2023).

Analisis Data

Pengambilan data setiap analisis dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan dan hasil dinyatakan dalam mean $\pm$ SD. Sebelum dilakukan pengujian hipotesis, data yang diperoleh dilakukan uji prasyarat analisis yang terdiri dari uji normalitas Shapiro Wilk dan uji homogenitas. Pengujian hipotesis dari hasil variasi gula dan lama fermentasi dari eco-enzyme terhadap kadar hidrogen peroksida dan zona hambat dilakukan

dengan Uji One Way Analisis Varian (ANOVA) dan diikuti Uji Tukey dengan taraf kesalahan 5%.

Hasil dan Pembahasan

Densitas Optik Bakteri

Densitas optik bakteri merupakan tingkat hamburan cahaya oleh bakteri dalam suatu kultur. Dengan menganalisis densitas optik bakteri dalam kurun waktu tertentu, jumlah sel bakteri dapat diprediksi. Besar densitas optik bakteri yang diperoleh dan diolah secara statistik dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Densitas Optik

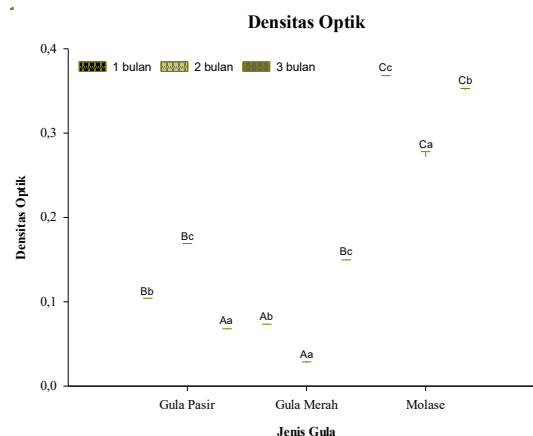
Jenis Gula	Densitas Optik		
	1 bulan	2 bulan	3 bulan
Pasir	0,104 $\pm$ 0,001 ^{Bb}	0,169 $\pm$ 0,001 ^{Bc}	0,067 $\pm$ 0,001 ^{Aa}
Merah	0,073 $\pm$ 0,000 ^{Ab}	0,027 $\pm$ 0,002 ^{Aa}	0,149 $\pm$ 0,001 ^{Bc}
Molase	0,368 $\pm$ 0,000 ^{Cc}	0,272 $\pm$ 0,006 ^{Ca}	0,351 $\pm$ 0,002 ^{Cb}

*data adalah rerata 3 kali replikasi dan diikuti dengan huruf berbeda yang menunjukkan perbedaan signifikan pada uji Tukey's Honest Significant Differences (HSD) dengan ($p < 0,05$). Huruf kapital menunjukkan perbedaan signifikan antara eco-enzyme dengan variasi gula, sedangkan huruf kecil menunjukkan perbedaan signifikan antara eco-enzyme dengan variasi lama fermentasi.

Data pada tabel 1 diperoleh densitas optik bakteri dari eco-enzyme dengan variasi gula menunjukkan perbedaan yang signifikan. Filtrat eco-enzyme yang difermentasi dengan molase, baik yang difermentasi selama 1, 2, dan 3 bulan, menunjukkan densitas optik tertinggi bila dibandingkan dengan eco-enzyme terfermentasi gula pasir dan gula merah. Selain itu, eco-enzyme terfermentasi gula pasir menunjukkan densitas optik yang lebih tinggi pada bulan pertama dan kedua bila dibandingkan dengan eco-enzyme terfermentasi gula merah. Sebaliknya, eco-enzyme terfermentasi gula merah menunjukkan densitas optik lebih tinggi dibanding eco-enzyme terfermentasi gula pasir pada bulan ketiga.

Selain pengaruh dari variasi gula terhadap besar densitas bakteri, variasi lama fermentasi menunjukkan perbedaan yang signifikan. Berdasarkan gambar 1, terdapat dua pola densitas optik bakteri dari eco-enzyme, yaitu densitas optik dari eco-enzyme terfermentasi gula pasir dan eco-enzyme terfermentasi gula merah dan molase. Pola pertama dari eco-enzyme terfermentasi gula pasir menunjukkan peningkatan densitas optik dari bulan pertama hingga kedua, lalu terjadi penurunan pada fermentasi di bulan ketiga. Ini menandakan bahwa

laju metabolisme pada variasi gula pasir ini mencapai titik tertinggi di bulan kedua. Sebaliknya, pada pola kedua yang ditunjukkan oleh eco-enzyme terfermentasi gula merah dan molase menunjukkan penurunan densitas optik di bulan kedua, kemudian terjadi peningkatan di bulan ketiga.



Gambar 1. Densitas Optik

Selama proses fermentasi, mikroba dalam eco-enzyme akan menggunakan glukosa sebagai sumber energi utama (Sopandi & Wardah, 2014). Secara berturut, gula pasir, gula merah, dan molase

mengandung glukosa sebanyak 100%, 60-80%, dan 30-50% (Al-Mhanna *et al.*, 2018; Prinz, 2019; (Adna Ridhani *et al.*, 2021). Data dari tabel 1 dan gambar 1 menunjukkan bahwa densitas optik bakteri pada eco-enzyme terfermentasi gula pasir mengalami peningkatan hingga pada bulan kedua dan menurun pada bulan ketiga karena seluruh glukosa bebas dari gula pasir telah digunakan dalam proses fermentasi oleh mikroba. Sebaliknya, baik pada eco-enzyme terfermentasi gula merah dan molase, menunjukkan desitas optik yang lebih tinggi dibandingkan eco-enzyme terfermentasi gula pasir meskipun mengandung glukosa yang lebih sedikit. Hal ini terlihat pada densitas optik yang menurun pada bulan kedua. Penurunan densitas optik ini menunjukkan terbatasnya kadar glukosa pada filtrat untuk mendukung proses fermentasi. Dengan terbatasnya glukosa bebas ini, mikroba akan menghidrolisis sukrosa dengan enzim sukrase untuk memutus ikatan glikosida menjadi glukosa dan fruktosa dari bahan organik yang digunakan dalam proses fermentasi (Reid & Abratt, 2005). Dengan demikian, terjadi peningkatan densitas optik pada bulan ketiga, baik pada eco-enzyme terfermentasi gula merah dan molase, dengan adanya glukosa hasil hidrolisis mikroba.

Eco-enzyme terfermentasi molase menunjukkan densitas optik tertinggi bila dibandingkan dengan eco-enzyme terfermentasi gula pasir dan gula merah, baik dengan lama fermentasi 1, 2, dan 3 bulan. Meskipun molase memiliki kadar glukosa paling sedikit bila dibandingkan dengan gula pasir dan gula merah, molase mengandung gula reduksi sebesar 50-65% (Permata Cika *et al.*, 2022), lebih tinggi bila dibandingkan dengan gula merah yang hanya 5-15% (Le *et al.*, 2020). Dengan demikian, mikroba dalam filtrat eco-enzyme terfermentasi molase tidak hanya mendapatkan glukosa sebagai sumber energi dalam bentuk glukosa bebas dan glukosa hasil hidrolisis dari bahan organik, mereka juga mendapat glukosa dari gula reduksi untuk mendukung laju fermentasi.

Kadar Hidrogen Peroksida

Hidrogen peroksida dihasilkan sebagai produk samping dari fermentasi bakteri asam laktat dalam eco-enzyme (Primarista *et al.*, 2023). Secara kuantitatif, kadar hidrogen peroksida yang ditentukan dengan titrasi permanganometri yang dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hidrogen Peroksida

Jenis Gula	Hidrogen Peroksida (ppm)		
	1 bulan	2 bulan	3 bulan
Pasir	206,96 ± 2,46 ^{Bb}	486,20 ± 2,46 ^{Bc}	194,20 ± 2,46 ^{Aa}
Merah	45,36 ± 2,46 ^{Aa}	51,03 ± 0,00 ^{Ab}	518,81 ± 0,00 ^{Bc}
Molase	1323,95 ± 2,46 ^{Cb}	851,92 ± 2,46 ^{Ca}	2283,59 ± 0,00 ^{Cc}

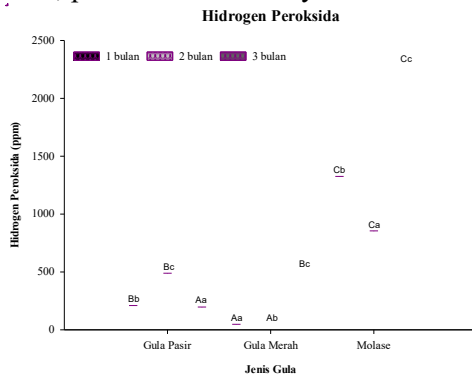
*data adalah rerata 3 kali replikasi dan diikuti dengan huruf berbeda yang menunjukkan perbedaan signifikan pada uji Tukey's Honest Significant Differences (HSD) dengan ($p < 0,05$). Huruf kapital menunjukkan perbedaan signifikan antara eco-enzyme dengan variasi gula, sedangkan huruf kecil menunjukkan perbedaan signifikan antara eco-enzyme dengan variasi lama fermentasi.

Eco-enzyme terfermentasi molase menunjukkan kadar hidrogen peroksida tertinggi dibandingkan dengan eco-enzyme terfermentasi gula pasir dan gula merah, baik yang difermentasi selama 1, 2, dan 3 bulan. Kadar hidrogen peroksida dan densitas optik bakteri pada eco-enzyme terfermentasi molase menunjukkan nilai tertinggi bila dibandingkan dengan gula lainnya, seperti yang terlihat pada gambar 2. Hidrogen peroksida terbentuk dalam fermentasi eco-enzyme melalui ektivitas enzimatik bakteri asam laktat seperti *Lactobacillus* dan yeast seperti *Saccharomyces*, yang menghasilkan hidrogen peroksida sebagai produk oksidatif dari metabolisme gula dan

oksigen terlarut (Prayitno & Hidayati, 2017), dimana bakteri asam laktat mendominasi selama proses fermentasi (1 hingga 3 bulan).

Hidrogen peroksida dihasilkan oleh bakteri asam laktat sebagai produk samping dari oksidasi glukosa atau fruktosa dari bahan organik menjadi glukonat (Sirithanakorn & Imlay, 2024); (Wang *et al.*, 2019). Temuan oleh Ningrum dkk (2024) menunjukkan bahwa jenis gula, secara berturut molase, gula merah, dan gula pasir, mempengaruhi pertumbuhan bakteri asam laktat dan yeast melalui gula reduksi dan mineral. Dengan demikian, terdapat hubungan antara kadar hidrogen peroksida dengan gula, baik dalam bentuk glukosa maupun gula

reduksi, pada filtrat eco-enzyme.



Gambar 2. Kadar Hidrogen Peroksida

Eco-enzyme terfermentasi gula pasir, terjadi peningkatan kadar hidrogen peroksida hingga bulan kedua yang menunjukkan bahwa mikroba mengoksidasi glukosa bebas dari gula pasir hingga di bulan kedua dan mengoksidasi glukosa hasil hidrolisis bahan organik di bulan ketiga. Sebaliknya, kadar hidrogen peroksida pada eco-enzyme terfermentasi gula merah dan

molase mengalami peningkatan signifikan pada bulan ketiga yang menunjukkan bahwa mikroba mengoksidasi glukosa, baik yang berasal dari gula reduksi maupun glukosa hasil hidrolisis dari bahan organik.

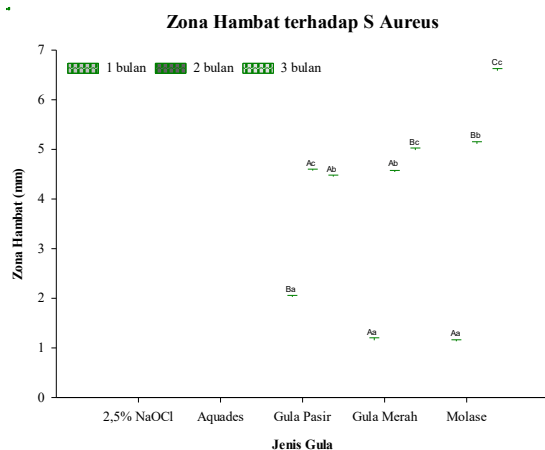
Zona Hambat terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

Aktivitas antibakteri, pada penelitian ini, dianalisis dari zona hambat yang terbentuk oleh filtrat eco-enzyme terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Zona hambat yang terbentuk baik oleh *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* ditampilkan pada tabel 3 dan 4 secara berturut. Dalam penelitian ini dilakukan pengujian zona hambat dari kontrol positif oleh natrium hipoklorit (NaOCl) dengan kadar 2,5% dan kontrol negatif oleh aquades terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* seperti yang terlihat pada gambar 3 dan 4.

Tabel 3. Zona Hambat Eco-Enzyme terhadap *Staphylococcus aureus*

Jenis Gula	Zona Hambat terhadap <i>S. Aureus</i> (mm)		
	1 bulan	2 bulan	3 bulan
Pasir	2,03 ± 0,03 ^{Ba}	4,57 ± 0,03 ^{Ac}	4,45 ± 0,03 ^{Ab}
Merah	1,15 ± 0,05 ^{Aa}	4,55 ± 0,03 ^{Ab}	4,99 ± 0,04 ^{Bc}
Molase	1,13 ± 0,03 ^{Aa}	5,11 ± 0,04 ^{Bb}	6,59 ± 0,04 ^{Cc}

*data adalah rerata 3 kali replikasi dan diikuti dengan huruf berbeda yang menunjukkan perbedaan signifikan pada uji Tukey's Honest Significant Differences (HSD) dengan ($p < 0,05$). Huruf kapital menunjukkan perbedaan signifikan antara eco-enzyme dengan variasi gula, sedangkan huruf kecil menunjukkan perbedaan signifikan antara eco-enzyme dengan variasi lama fermentasi.



Gambar 3. Zona Hambat Eco-Enzyme terhadap *Staphylococcus aureus*

Filtrat eco-enzyme, baik terfermentasi gula pasir, gula merah, dan molase, menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap

Staphylococcus aureus seperti yang terlihat pada tabel 3. Bulan pertama, eco-enzyme terfermentasi gula pasir, gula merah, dan molase menunjukkan aktivitas antibakteri yang sangat lemah (1-2 mm) bila dibandingkan dengan eco-enzyme yang difermentasi selama 2 dan 3 bulan (lebih dari 4,5 mm). Kecuali eco-enzyme terfermentasi molase selama 1 bulan, filtrat ini menunjukkan aktivitas antibakteri yang lebih tinggi dibandingkan dengan eco-enzyme terfermentasi gula pasir dan gula merah. Selain itu, gambar 3 terlihat perbandingan aktivitas antibakteri dari eco-enzyme dan natrium hipoklorit terhadap *Staphylococcus aureus*, dimana zona hambat natrium hipoklorit terhadap *Staphylococcus aureus* adalah 3,69 mm. Natrium hipoklorit merupakan senyawa yang digunakan sebagai disinfektan karena kemampuannya sebagai antibakteri (Mozartha *et al.*, 2019). Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa eco-

enzyme yang difermentasi lebih dari 2 bulan dapat digunakan sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*.

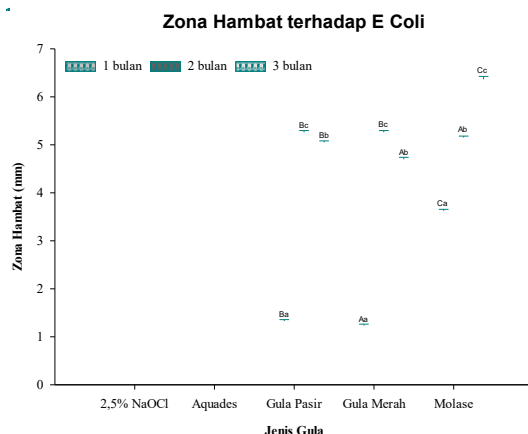
Filtrat eco-enzyme, baik terfermentasi gula pasir, gula merah, dan molase, menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli*, seperti data yang ditunjukkan pada tabel 4 dan gambar 4. Filtrat eco-enzyme yang difermentasi selama 1 bulan menunjukkan aktivitas antibakteri yang sangat lemah (± 1 mm), kecuali eco-enzyme terfermentasi molase (3,63 mm). Selain itu, eco-enzyme terfermentasi molase menunjukkan aktivitas antibakteri yang lebih tinggi dibandingkan

dengan natrium hipoklorit (3,31 mm), seperti yang terlihat pada gambar 4. Eco-enzyme terfermentasi gula pasir dan gula merah menunjukkan penurunan aktivitas antibakteri pada bulan ketiga bila dibandingkan dengan bulan kedua. Secara keseluruhan, eco-enzyme terfermentasi molase menunjukkan aktivitas antibakteri yang lebih tinggi dibandingkan dengan eco-enzyme terfermentasi gula pasir dan gula merah. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa eco-enzyme yang difermentasi lebih dari 2 bulan dapat digunakan sebagai antibakteri terhadap *Escherichia coli*.

Tabel 4. Zona Hambat Eco-Enzyme terhadap *Escherichia coli*

Jenis Gula	Zona Hambat terhadap <i>E Coli</i> (mm)		
	1 bulan	2 bulan	3 bulan
Pasir	1,33 $\pm$ 0,03 ^{Ba}	5,26 $\pm$ 0,04 ^{Bc}	5,05 $\pm$ 0,03 ^{Bb}
Merah	1,23 $\pm$ 0,03 ^{Aa}	5,26 $\pm$ 0,04 ^{Bc}	4,70 $\pm$ 0,04 ^{Ab}
Molase	3,63 $\pm$ 0,03 ^{Ca}	5,15 $\pm$ 0,03 ^{Ab}	6,37 $\pm$ 0,06 ^{Cc}

*data adalah rerata 3 kali replikasi dan diikuti dengan huruf berbeda yang menunjukkan perbedaan signifikan pada uji Tukey's Honest Significant Differences (HSD) dengan ($p < 0,05$). Huruf kapital menunjukkan perbedaan signifikan antara eco-enzyme dengan variasi gula, sedangkan huruf kecil menunjukkan perbedaan signifikan antara eco-enzyme dengan variasi lama fermentasi.



Gambar 4. Zona Hambat Eco-Enzyme terhadap *Escherichia coli*

Eco-enzyme, baik terfermentasi gula pasir, gula merah, dan molase, menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Namun, eco-enzyme terfermentasi molase menunjukkan peningkatan aktivitas antibakteri, seiring dengan bertambahnya lama fermentasi. Hal ini dikarenakan molase, secara alami, mengandung mineral seperti kalium (K), Kalsium (Ca), Magnesium (Mg), Zat Besi (Fe), Fosfor (P), dan Seng (Zn) yang menunjukkan aktivitas sebagai kofaktor enzim sehingga mendukung metabolisme mikroba dalam filtrat

eco-enzyme (Tsalet et al., 2024; Oliva-Neto & Yokoya, 2001). Selain itu, molase mengandung senyawa dehidrodiconiferylalcohol-9'-O-beta-D-glucopyranoside dan isoorientin-7,3'-Odimethyl ether yang menunjukkan aktivitas antibakteri (Takara et al., 2007). Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa aktivitas antibakteri terbaik dari eco-enzyme terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* berasal dari eco-enzyme terfermentasi molase selama tiga bulan.

Kesimpulan

Pada penelitian ini ditemukan bahwa jenis gula mempengaruhi densitas optik bakteri dan kadar hidrogen peroksida dari eco-enzyme. Eco-enzyme terfermentasi gula pasir memiliki densitas optik bakteri dan kadar hidrogen peroksida tertinggi ketika difermentasi selama dua bulan, sedangkan eco-enzyme terfermentasi gula merah dan molase memiliki densitas optik bakteri dan kadar hidrogen peroksida tertinggi setelah difermentasi selama tiga bulan. Eco-enzyme, baik difermentasi dengan gula pasir, gula merah, dan molase, menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Namun, aktivitas antibakteri

tertinggi terhadap kedua bakteri tersebut ditunjukkan oleh eco-enzyme terfermentasi molase selama tiga bulan.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Ibu Arie Srihardyastutie dari Departemen Kimia Universitas Brawijaya dan Ibu Tri Ardyati dari Departemen Biologi Universitas Brawijaya atas inspirasi yang diberikan kepada penulis dalam penelitian ini.

Referensi

- Adna Ridhani, M., Prahastiwi Vidyaningrum, I., Nazzala Akmala, N., Fatihatunisa, R., Azzahro, S., Aini, N., Studi Teknologi Pangan, P., Pertanian, J., & Jenderal Soedirman Jalan Soeparno, U. (2021). Potensi Penambahan Berbagai Jenis Gula Terhadap Sifat Sensori Dan Fisikokimia Roti Manis: Review. *Pasundan Food Technology Journal (PFTJ)*, 8(3). <https://journal.unpas.ac.id/index.php/foodtechnology/article/download/4106/2118>
- Al-Mhanna, N. M., Huebner, H., & Buchholz, R. (2018). Analysis of the sugar content in food products by using gas chromatography mass spectrometry and enzymatic methods. *Foods*, 7(11). <https://doi.org/10.3390/foods7110185>
- Aminullah, Indarwati, & Dwi Haryanta. (2025). Cocopeat Study with the Addition of NPK Fertilizer and Eco Enzyme as a Planting Medium for Water Spinach Microgreens (*Ipomea aquatica*). *Journal of Applied Plant Technology (JAPT)*, 4(1), 11–19. <https://doi.org/10.30742/v3ansq16>
- Ashokkumar, A., Mala, P., Arun, C., & Geetha, K. (2024). Enhancing Shelf Lifestorage Stability of Anaerobically Fermented Garbage Enzyme by Concentrating through Membrane Separation. *Journal of Environmental Nanotechnology*, 13(2), 264–269. <https://doi.org/10.13074/jent.2024.06.2426>
- Bulai, I. S., Adamu, H., Umar, Y. A., & Sabo, A. (2021). Biocatalytic remediation of used motor oil-contaminated soil by fruit garbage enzymes. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(4), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105465>
- Dewi, N. P., Teti Vani, A., Abdullah, D., Triansyah, I., Zulkarnaini, A., & Septiana, V. T. (2025). Edukasi Normalisasi Air Sungai Paska Banjir Untuk Keperluan Rumah Tangga Di Taluak Tigo Sakato Menggunakan Eco Enzyme. *Nusantara Hasana Journal*, 4(12), 80–86.
- Dwijastuti, N. M. S., Dewi, I. G. A. A. S., Septiasari, N. P. S., & Maharani, I. G. A. P. (2025). Antimicrobial Activity of Ecoenzyme against *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* as an Alternative Antiseptic Mouthwash. *Indonesian Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 9(1), 1–8.
- Gattupalli, M., Dashora, K., Javed, Z., & Tripathi, G. D. (2024). Exploring garbage enzymes as novel biocatalyst for enhancing bioprocess performance in composting. In *Process Safety and Environmental Protection* (Vol. 188, pp. 73–80). Institution of Chemical Engineers. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2024.05.080>
- Hanifah, A., Primarista, N. P. V., Prasetyawan, S., Safitri, A., Adyati, T., & Srihadyastutie, A. (2022). The Effect of Variations in Sugar Types and Fermentation Time on Enzyme Activity and Total Titrated Acid on Eco-Enzyme Results of Fermentation. *Advances in Biological Sciences Research*, 585–589. <https://doi.org/https://doi.org/10.2991/absr.k.220406.084>
- Harahap, A. H., & Negara, A. B. W. (2025). Pengaruh Pemberian Pupuk Eco Enzyme Terhadap Pertumbuhan Rumput Gajah *Pennisetum Purpureum*. *Journal of Innovation Research and Knowledge*, 5(1), 591–598.
- Heltina, D., Waruwu, D., Amelia, R., & Yovi, M. (2025). Pengembangan Usaha Pertanian Masyarakat Desa Pekan Tua Dengan Pemanfaatan Limbah Dapur melalui Eco-Enzyme. *Jurnal Pengabdian Masyarakat Bangsa*, 3(4), 1333–1338. <https://jurnalpengabdianmasyarakatbangsa.com/index.php/jpmmba/index>
- Jelita, R. (2022). Produksi Eco Enzyme dengan Pemanfaatan Limbah Rumah Tangga untuk

- Menjaga Kesehatan Masyarakat di Era New Normal. *Jurnal Maitreyawira*, 3(1).
- Kementerian Lingkungan Hidup dan Kehutanan. (2025). *TIMBULAN SAMPAH*. Sistem Informasi Pengelolaan Sampah Nasional (SIPSN). <https://sipsn.kemenvh.go.id/sipsn/public/data/timbulan>
- Le, D. H. T., Lu, W. C., & Li, P. H. (2020). Sustainable processes and chemical characterization of natural food additives: Palmyra palm (*Borassus flabellifer* Linn.) granulated sugar. *Sustainability (Switzerland)*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/su12072650>
- Lubis, N., Damayanti, R., & Wardani, S. (2025). Antimicrobial Activity of Eco-enzymes with Various Dilutions As A Natural Disinfectant. *Jurnal Penelitian Pendidikan IPA*, 11(5), 506–513. <https://doi.org/10.29303/jppipa.v11i5.11052>
- Mavani, H. A. K., Tew, I. M., Wong, L., Yew, H. Z., Mahyuddin, A., Ghazali, R. A., & Pow, E. H. N. (2020). Antimicrobial efficacy of fruit peels eco-enzyme against *Enterococcus faecalis*: An in vitro study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(14), 1–12. <https://doi.org/10.3390/ijerph17145107>
- Mozartha, M., Silvia, P., & Sujatmiko, B. (2019). Perbandingan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Curcuma zedoaria dan Bahan Irigasi Natrium Hipoklorit 2.5% terhadap *Enterococcus faecalis* Comparison of Antibacterial Activity of Curcuma zedoaria Extracts and 2.5% Sodium Hypochlorite Irrigant on *Enterococcus faecalis*. *Jurnal Material Kedokteran Gigi*, 8(1), 22–29. <http://jurnal.pdgi.or.id/index.php/jmkg/article/download/330/330>
- Muawanah, Afiah, N., & Mashudi, E. (2020). Penetapan Kadar Hidrogen Peroksida (H₂O₂) Pada Tahu Dengan Metode Permanganometri. *Jurnal Medika: Media Ilmiah Analis Kesehatan*, 5(2), 9–13. <https://jurnal.poltekmu.ac.id/index.php/medika/article/view/179/137>
- Muliarta, I. N. (2024). Global Warming Mitigation Innovation Through Household Waste Management Becomes Eco-Enzyme: A Review. *Jurnal Penelitian Pendidikan IPA*, 10(8), 515–525. <https://doi.org/10.29303/jppipa.v10i8.8154>
- Nalladiyil, A., Prakash, P., & Sivakumar Babu, G. L. (2023). Garbage enzyme-mediated treatment of landfill leachate: A sustainable approach. *Bioresource Technology*, 385, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129361>
- Novianti, T., Saraswati, H., Hafsa, H., & Seprianto. (2025). Metagenomic insights into bacterial communities in eco-enzymes and their microbial diversity and abundance. *Biodiversitas*, 26(5), 2157–2166. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d260514>
- Oliva-Neto, P. de, & Yokoya, F. (2001). Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria from the alcohol industry to several antimicrobial compounds. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32(1), 10–14. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822001000100003>
- Permata Cika, A. F., Uztamila, Y., Effendy A, S., Syarif, A., & Hajar, I. (2022). Pengaruh pH Fermentasi dan Putaran Pengadukan pada Fermentasi Molasses terhadap Produksi Bioetanol. *Jurnal Pendidikan Dan Teknologi Indonesia*, 2(1), 561–567. <https://doi.org/10.52436/1.jpti.107>
- Prayitno, T. A., & Hidayati, N. (2017). *Pengantar Mikrobiologi* (1st ed.). Media Nusa Creative.
- Primarista, N. P. V., Hanifah, I. A., Prasetyawan, S., Andayani, U., Ardyati, T., & Srihadyastutie, A. (2023). Effect of Eco-Enzyme's Storage Duration on Hydrogen Peroxide Level and Its Antibacterial Activity. *The Indonesian Green Technology Journal*, 1. <https://doi.org/10.21776/ub.igtj.2023.012.01.03>
- Prinz, P. (2019). The role of dietary sugars in health: molecular composition or just calories? *European Journal of Clinical Nutrition*, 73(9), 1216–1223. <https://doi.org/10.1038/s41430-019-0407-z>
- Rahman, S., Haque, I., Goswami, R. C. D., Barooah, P., Sood, K., & Choudhury, B. (2021). Characterization and FPLC Analysis of Garbage Enzyme: Biocatalytic

- and Antimicrobial Activity. *Waste and Biomass Valorization*, 12(1), 293–302. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-00956-z>
- Rasit, N., Hwe Fern, L., & Azlina Wan Ab Karim Ghani, W. (2019). Orange Wastes and Its Influence on The Aquaculture Sludge. *International Journal of Civil Engineering and Technology*, 10(3), 967–980.
- Reid, S. J., & Abratt, V. R. (2005). Sucrose utilisation in bacteria: genetic organisation and regulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(3), 312–321. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1885-y>
- Rosmania, & Yanti, F. (2020). Perhitungan jumlah bakteri di Laboratorium Mikrobiologi menggunakan pengembangan metode Spektrofotometri. *Jurnal Penelitian Sains*, 22(2), 76–86. <https://ejurnal.mipa.unsri.ac.id/index.php/jps/article/view/564>
- Sari, G. L., Adzillah, W. N., Ratnawati, K., Sari, D. F. A., & Saidah, S. (2025). Analysis of Eco-Enzyme Potential to Reduce BOD, COD, Oil and Grease Concentrations in Raw Water for Treated Water in Karawang: A Laboratory Experiment. *Gema Lingkungan Kesehatan*, 23(1), 6–13. <https://doi.org/10.36568/gelinkes.v23i1.148>
- Sholihah, D. D., & Pratama N. T., J. (2025). The Dynamic Role of Women in a Circular Economy through Eco Enzyme Training. *Nusantara Science and Technology Proceedings*, 538–542. <https://doi.org/10.11594/nstp.2025.4779>
- Simanjuntak, P., Panataria, L. R., & Purba, I. E. (2025). The Effect Of Giving Cow Manure And Liquid Organic Fertilizer On Growth And Production Sweet Corn Plant. *Tumbuhan : Publikasi Ilmu Sosiologi Pertanian Dan Ilmu Kehutanan*, 2(2), 81–96. <https://doi.org/10.62951/tumbuhan.v2i2.325>
- Sirithanakorn, C., & Imlay, J. A. (2024). Evidence for endogenous hydrogen peroxide production by E. coli fatty acyl-CoA dehydrogenase. *PLOS ONE*, 19(10), e0309988. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0309988>
- Sopandi, T., & Wardah. (2014). *Mikrobiologi Pangan: Teori dan Praktik* (1st ed.). ANDI.
- Suriani, M., Winarti, S., Arifin, S., Alpian, & Firlianty. (2023). Diversity Of Decomposer Bacteria In Eco Enzyme Fermentation Process Of Organic Materials Using Oxford Nanopore Technology (ONT) And Its Effectiveness In Inhibiting E-Coli In Fish Pond With Water Mineral Soil. *Revista de Gestao Social e Ambiental*, 17(8), 1–20. <https://doi.org/10.24857/rgsa.v17n8-009>
- Takara, K., Ushijima, K., Wada, K., Iwasaki, H., & Yamashita, M. (2007). Phenolic Compounds from Sugarcane Molasses Possessing Antibacterial Activity against Cariogenic Bacteria. *Journal of Oleo Science*, 56(11), 611–614. <https://doi.org/10.5650/jos.56.611>
- Tsael, Y. L., Lestari, G. A. Y., Oematan, G., & Benu, I. (2024). Pengaruh Lama Waktu Biofermentasi Chromolaena Odorata dengan Sumber Karbon Gula Lontar Cair terhadap Kandungan NDF, ADF Serta Mineral Ca dan P. *Animal Agricultura*, 2(1), 391–399. <https://doi.org/10.59891/animacultura.v2i1.57>
- Valverde, M., Lozano-Salgado, J., Fortini, P., Rodriguez-Sastre, M. A., Rojas, E., & Dogliotti, E. (2018). Hydrogen peroxide-induced DNA damage and repair through the differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells International*, 2018, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2018/1615497>
- Wang, B., Walton, P. H., & Rovira, C. (2019). Molecular Mechanisms of Oxygen Activation and Hydrogen Peroxide Formation in Lytic Polysaccharide Monooxygenases. *ACS Catalysis*, 9(6), 4958–4969. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b00778>
- Widyasari, N. L., & Wiratama, I. G. N. M. (2021). Studi Teknik Bioremediasi Tanah Tercemar Logam Berat Dengan Menggunakan Eco-Enzyme. *Jurnal Ecocentrism*, 1, 89–95. <https://jdbioremed.wixsite.com/bioremediation/background>