© 2026 Program Studi Ilmu Lingkungan Sekolah Pascasarjana UNDIP
JURNAL ILMU LINGKUNGAN
Volume 24 Issue 5 (2026) : 1280-1289 *ISSN 1829-8907*

Respons Nilai BOD_5 Terhadap Bioaugmentasi *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus subtilis*, Penambahan Molase, serta Kombinasi *P. aeruginosa–molase* pada Limbah Cair Industri Farmasi

Salamah Ashima Rahmah*, Ary Sri Astuti, Khusni Yahya, Endang Sri Lestari, dan Stefani Candra Firmanti

Program Studi Ilmu Biomedik, konsentrasi Teknologi Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro, Indonesia; e-mail: salamahashima23@students.undip.ac.id

ABSTRAK

Limbah cair industri farmasi mengandung bahan organik yang dapat meningkatkan kebutuhan oksigen biologis dan berpotensi menurunkan kualitas lingkungan perairan. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi respons *Biochemical Oxygen Demand* (BOD_5) terhadap bioaugmentasi *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, penambahan molase, serta kombinasi *P. aeruginosa* dan molase pada limbah cair industri farmasi. Penelitian dilakukan secara eksperimental menggunakan sampel limbah dari outlet IPAL industri farmasi yang diambil pada minggu berbeda untuk setiap tahap pengujian. Bioaugmentasi dilakukan pada konsentrasi 0,25; 0,50; dan 1,00 McFarland, sedangkan molase diberikan pada konsentrasi 0,50; 1,00; dan 2,00 g/L. Perlakuan kombinasi menggunakan *P. aeruginosa* 0,50 McFarland dengan molase 0,25 dan 0,50 g/L. BOD_5 diukur menggunakan metode *Winkler* dan dianalisis menggunakan *One-Way ANOVA* serta uji LSD pada taraf 5%. *P. aeruginosa* menghasilkan BOD_5 lebih rendah dibandingkan kontrol, tetapi ketiga konsentrasi inokulum tidak berbeda nyata. Sebaliknya, *B. subtilis* dan molase secara tunggal menghasilkan BOD_5 lebih tinggi dibandingkan kontrol. Perlakuan kombinasi menghasilkan BOD_5 lebih rendah dibandingkan kontrol, sedangkan kedua konsentrasi molase tidak berbeda nyata. Hasil menunjukkan bahwa respons BOD_5 berbeda bergantung pada jenis perlakuan dan kondisi pengujian, sehingga penerapan bioaugmentasi perlu mempertimbangkan karakteristik limbah dan kondisi operasional pengolahan.

***Kata kunci*:** *Biochemical Oxygen Demand* (BOD_5), bioaugmentasi, limbah cair industri farmasi, molase, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*

ABSTRACT

Pharmaceutical industry wastewater contains organic compounds that can increase biological oxygen demand and potentially degrade aquatic environmental quality. This study aimed to evaluate the response of 5-day Biochemical Oxygen Demand (BOD_5) to bioaugmentation with *Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis*, molasses addition, and the combination of *P. aeruginosa* and molasses in pharmaceutical industry wastewater. An experimental study was conducted using wastewater samples collected from the outlet of a pharmaceutical industry wastewater treatment plant (WWTP) on different weeks for each testing stage. Bioaugmentation was performed at inoculum concentrations of 0.25, 0.50, and 1.00 McFarland, while molasses was added at concentrations of 0.50, 1.00, and 2.00 g/L. The combined treatment consisted of *P. aeruginosa* at 0.50 McFarland with molasses at 0.25 and 0.50 g/L. BOD_5 was determined using the Winkler method and data were analyzed by one-way ANOVA followed by LSD post-hoc test at the 5% significance level. *P. aeruginosa* treatment resulted in lower BOD_5 values compared to the control, although no significant differences were observed among the three inoculum concentrations. In contrast, *B. subtilis* and molasses applied individually yielded higher BOD_5 values than the control. The combined treatment produced lower BOD_5 values than the control, with no significant difference between the two molasses concentrations. These findings indicate that BOD_5 responses vary depending on the type of treatment and testing conditions, suggesting that the application of bioaugmentation should consider wastewater characteristics and operational treatment conditions.

***Keywords*:** Biochemical Oxygen Demand (BOD), bioaugmentation, pharmaceutical industry wastewater, molasses, *Bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa*

Citation: Rahmah, S. A., Astuti, A. S., Yahya, K., Lestari, E. S., dan Firmanti, S. C. (2026). Respons Nilai BOD_5 Terhadap Bioaugmentasi *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus subtilis*, Penambahan Molase, serta Kombinasi *P. aeruginosa–molase* pada Limbah Cair Industri Farmasi. Jurnal Ilmu Lingkungan, 24(5), 1280–1289. doi:10.14710/jil.24.5.1280-1289

1. PENDAHULUAN

Industri farmasi memainkan peran penting dalam penyediaan produk kesehatan, namun proses produksinya menghasilkan limbah cair yang mengandung berbagai senyawa organik dan polutan yang berpotensi mencemari lingkungan (Dai *et al.*, 2023; Khalidi-Idrissi *et al.*, 2023). Limbah cair yang tidak dikelola secara memadai dapat menurunkan kualitas badan air penerima melalui peningkatan kebutuhan oksigen dan penurunan kadar oksigen terlarut (DO), yang selanjutnya dapat berdampak terhadap ekosistem akuatik (Edokpayi *et al.*, 2017). Oleh karena itu, pengelolaan limbah cair industri farmasi memerlukan sistem pengolahan yang efektif untuk mengurangi beban pencemar organik sebelum limbah dilepaskan ke lingkungan.

Salah satu parameter utama untuk menilai beban pencemar organik adalah *Biochemical Oxygen Demand* lima hari (BOD_5), yaitu jumlah oksigen yang dikonsumsi oleh mikroorganisme untuk mengoksidasi bahan organik yang dapat terbiodegradasi dalam air selama periode lima hari pada kondisi pengujian standar (Maddah, 2022). BOD_5 merupakan indikator tidak langsung terhadap kandungan bahan organik yang dapat terbiodegradasi dalam air karena pengukurannya didasarkan pada konsumsi oksigen selama proses penguraian biologis. Semakin tinggi kebutuhan oksigen untuk proses tersebut, semakin besar oksigen yang dikonsumsi dari sistem, sehingga kadar oksigen terlarut (DO) dapat mengalami penurunan (Maddah, 2022). Pengolahan limbah cair dapat dilakukan melalui metode fisika, kimia, atau biologis. Pengolahan biologis menjadi salah satu alternatif yang relatif ekonomis dan ramah lingkungan karena memanfaatkan aktivitas mikroorganisme dalam menguraikan atau menghilangkan berbagai pencemar organik dari limbah cair (Khalidi-Idrissi *et al.*, 2023).

Bioaugmentasi merupakan salah satu strategi dalam pengolahan biologis dengan menambahkan mikroorganisme tertentu untuk mendukung proses biodegradasi bahan organik. Respons bioaugmentasi dapat dipengaruhi oleh jenis mikroorganisme dan karakteristik limbah yang digunakan. *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus subtilis* merupakan mikroorganisme yang telah digunakan dalam berbagai proses biodegradasi dan bioremediasi. *P. aeruginosa* memiliki fleksibilitas metabolik yang memungkinkan pemanfaatan berbagai senyawa organik dan telah menunjukkan potensi dalam bioremediasi limbah industri, termasuk dalam penurunan parameter BOD dan COD (Shah *et al.*, 2025). *B. subtilis* juga telah digunakan dalam bioremediasi limbah cair industri farmasi dan dilaporkan mampu menurunkan BOD dan COD selama proses pengolahan (Kehinde *et al.*, 2022). Pemilihan *P. aeruginosa* dan *B. subtilis* dalam penelitian ini didasarkan pada potensi keduanya dalam memanfaatkan dan mendegradasi senyawa organik pada limbah cair, dengan *B. subtilis* telah dilaporkan pada pengolahan limbah cair industri farmasi. Penggunaan kedua mikroorganisme tersebut memungkinkan evaluasi respons BOD_5 terhadap bioaugmentasi oleh bakteri dengan karakteristik biodegradasi yang berbeda pada limbah cair industri farmasi.

Selain mikroorganisme, ketersediaan sumber karbon juga dapat memengaruhi proses biologis. Molase dapat digunakan sebagai sumber karbon eksternal dalam pengolahan biologis karena mengandung senyawa organik yang mudah tersedia bagi mikroorganisme (Dias *et al.*, 2020; Ignatowicz and Smyk, 2020). Penambahan molase dapat meningkatkan ketersediaan karbon yang mudah terbiodegradasi dalam sistem, tetapi jumlah sumber karbon yang diberikan perlu disesuaikan dengan kondisi pengolahan karena penambahan bahan organik juga dapat meningkatkan beban organik sistem (Ignatowicz and Smyk, 2020; Chuda et al., 2023). Respons BOD terhadap penambahan molase perlu dievaluasi karena peningkatan ketersediaan substrat organik dapat meningkatkan beban organik yang harus dioksidasi secara biologis dalam sistem.

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa penambahan mikroorganisme dapat memengaruhi nilai BOD_5 dan proses biodegradasi, tetapi responsnya dapat berbeda bergantung pada jenis mikroorganisme dan karakteristik limbah (Almutairi, 2020). Hal tersebut menunjukkan bahwa penambahan mikroorganisme tidak selalu menghasilkan penurunan BOD_5, sehingga efektivitas bioaugmentasi perlu dievaluasi berdasarkan kondisi dan karakteristik sistem yang digunakan. Namun, penelitian yang secara khusus mengevaluasi dan membandingkan respons BOD_5 terhadap penggunaan *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, molase, serta kombinasi *P. aeruginosa*–molase pada limbah cair industri farmasi masih terbatas. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi respons nilai BOD_5 terhadap bioaugmentasi *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, penambahan molase, dan kombinasi *P. aeruginosa*–molase pada limbah cair IPAL industri farmasi. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai respons BOD_5 terhadap penerapan bioaugmentasi dan penambahan sumber karbon pada limbah cair industri farmasi serta menjadi dasar untuk penelitian lebih lanjut mengenai optimasi kondisi pengolahan biologis.

2. METODE PENELITIAN

2.1. Pengambilan dan Penanganan Sampel

Penelitian ini menggunakan sampel limbah cair yang berasal dari Instalasi Pengolahan Air Limbah (IPAL) industri farmasi. Pengambilan sampel dilakukan secara *grab sampling* pada titik outlet IPAL menggunakan jerigen plastik steril yang telah dibilas terlebih dahulu menggunakan sampel limbah untuk meminimalkan potensi kontaminasi. Pengambilan

© 2026, Program Studi Ilmu Lingkungan Sekolah Pascasarjana UNDIP

sampel dilakukan pada minggu yang berbeda untuk setiap tahap pengujian, yaitu tahap bioaugmentasi *P. aeruginosa*, bioaugmentasi *B. subtilis*, penambahan molase, dan perlakuan kombinasi *P. aeruginosa*–molase. Pada setiap jenis pengujian, kelompok kontrol dan perlakuan menggunakan sampel yang berasal dari satu kali pengambilan (satu batch) yang sama. Pengujian dilakukan secara terpisah menggunakan batch sampel masing-masing, sehingga perbandingan hasil dilakukan antara kontrol dan perlakuan dalam batch yang sama.

Sampel yang diperoleh segera dibawa ke laboratorium dan langsung digunakan untuk rangkaian pengujian pada tahap masing-masing tanpa penyimpanan dalam waktu yang lama sehingga perubahan karakteristik limbah dapat diminimalkan. Pada setiap tahap pengujian, sampel untuk kelompok kontrol dan perlakuan berasal dari pengambilan limbah yang sama. Sebelum diberikan perlakuan, dilakukan pengukuran karakteristik awal yang meliputi BOD_5, pH, dan suhu. BOD_5 digunakan sebagai parameter utama penelitian, sedangkan pH dan suhu digunakan sebagai parameter pendukung untuk menggambarkan kondisi awal sampel dan lingkungan selama proses pengujian.

2.2. Kelompok Perlakuan

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen dengan variasi perlakuan bioaugmentasi dan penambahan molase. Pengujian dilakukan secara bertahap dalam empat tahap menggunakan sampel limbah yang diambil pada minggu yang berbeda dari sumber IPAL yang sama. Tahap pertama terdiri atas kontrol dan bioaugmentasi *P. aeruginosa*, tahap kedua terdiri atas kontrol dan bioaugmentasi *B. subtilis*, tahap ketiga terdiri atas kontrol dan penambahan molase, sedangkan tahap keempat terdiri atas kontrol dan perlakuan kombinasi *P. aeruginosa*–molase. Pada setiap tahap, kelompok kontrol dan perlakuan menggunakan sampel limbah yang berasal dari pengambilan pada waktu yang sama sehingga dapat digunakan sebagai pembanding internal.

Bioaugmentasi *P. aeruginosa* dan *B. subtilis* dilakukan menggunakan konsentrasi inoculum 0,25; 0,50; dan 1,00 McFarland. Perlakuan molase dilakukan pada konsentrasi 0,50; 1,00; dan 2,00 g/L. Perlakuan kombinasi menggunakan *P. aeruginosa* 0,50 McFarland yang dikombinasikan dengan molase 0,25 g/L dan 0,50 g/L. Pemilihan *P. aeruginosa* 0,50 McFarland pada perlakuan kombinasi didasarkan pada hasil pengujian bioaugmentasi tunggal, di mana konsentrasi tersebut menghasilkan nilai BOD_5 rata-rata terendah secara deskriptif dibandingkan konsentrasi 0,25 dan 1,00 McFarland. Ketiga konsentrasi tersebut tidak menunjukkan perbedaan nyata berdasarkan uji LSD. Konsentrasi 0,50 McFarland selanjutnya digunakan pada perlakuan kombinasi sebagai konsentrasi yang dipilih berdasarkan hasil deskriptif tersebut. Konsentrasi molase 0,25 g/L dan 0,50 g/L digunakan pada perlakuan kombinasi untuk mengevaluasi respons BOD_5 terhadap dua tingkat penambahan sumber karbon.

Secara keseluruhan, penelitian terdiri atas 15 kelompok, yang mencakup empat kelompok kontrol sesuai tahap pengujian, tiga perlakuan bioaugmentasi *P. aeruginosa*, tiga perlakuan bioaugmentasi *B. subtilis*, tiga perlakuan molase, dan dua perlakuan kombinasi. Setiap kelompok menggunakan dua botol pengukuran (duplo) yang berasal dari sampel limbah pada tahap pengujian yang sama.

Tabel 1. Rancangan Perlakuan Penelitian

Perlakuan	Konsentrasi
Kontrol tahap	Tanpa penambahan
P. aeruginosa	0,25 McFarland
P. aeruginosa	0,50 McFarland
P. aeruginosa	1,00 McFarland
Kontrol tahap	Tanpa penambahan
B. subtilis	0,25 McFarland
B. subtilis	0,50 McFarland
B. subtilis	1,00 McFarland
Kontrol tahap Molase	Tanpa penambahan
Molase	0,50 g/L
Molase	1,00 g/L
Molase	2,00 g/L
Kontrol tahap	Tanpa penambahan
P. aeruginosa + Molase	0,50 McFarland + 0,25 g/L
P. aeruginosa + Molase	0,50 McFarland + 0,50 g/L

2.3. Perlakuan Bioaugmentasi dan Penambahan Molase

Isolat *P. aeruginosa* ATCC 9027 dan *B. subtilis* ATCC 6051 berasal dari kultur asli dan diremajakan melalui tiga kali subkultur pada media *Tryptic Soy Agar* (TSA). Kultur diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Koloni tunggal dari subkultur terakhir digunakan untuk menyiapkan suspensi bakteri dalam larutan NaCl fisiologis steril (0,9%). Kekeruhan suspensi disesuaikan menggunakan densitometer (*DensiChek*, bioMérieux, France) berdasarkan standar McFarland hingga mencapai 0,25; 0,50; dan 1,00 sesuai perlakuan (Bhakti *et al.*, 2023).

Perlakuan biodegradasi dilakukan menggunakan Erlenmeyer berkapasitas 2 L yang berisi 1 L sampel limbah cair. Pada perlakuan bioaugmentasi, sebanyak 3 mL suspensi *P. aeruginosa* atau *B. subtilis* dengan konsentrasi sesuai perlakuan ditambahkan ke dalam sampel limbah. Pada perlakuan molase, molase ditimbang secara langsung dan ditambahkan ke dalam sampel dengan konsentrasi 0,5; 1,0; dan 2,0 g/L. Pada perlakuan kombinasi, sebanyak 3 mL suspensi *P. aeruginosa* 0,50 McFarland ditambahkan terlebih dahulu, kemudian diikuti penambahan molase dengan konsentrasi 0,25 atau 0,5 g/L.

Setelah pemberian perlakuan, seluruh reaktor diinkubasi selama 5 hari pada suhu 32,5°C dalam inkubator tertutup. Erlenmeyer ditutup menggunakan kapas steril yang memungkinkan pertukaran udara secara pasif. Selama inkubasi, pengadukan dilakukan secara berkala menggunakan *magnetic stirrer* IKA C-MAG HS 4 pada pengaturan kecepatan 4. Setelah

© 2026, Program Studi Ilmu Lingkungan Sekolah Pascasarjana UNDIP

periode perlakuan selesai, sampel digunakan untuk pengujian parameter.

2.4. Pengukuran Parameter

Pengujian BOD_5 dilakukan mengacu pada *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* metode 5210 B (APHA, 2017) menggunakan metode *Winkler* melalui titrasi iodometri. Setelah periode perlakuan biodegradasi selama 5 hari selesai, sampel dari setiap reaktor digunakan untuk pengujian BOD_5. Sampel kemudian dibagi ke dalam enam botol BOD, yang terdiri atas dua botol H0, dua botol H3, dan dua botol H5. Botol H0 digunakan untuk mengukur kadar oksigen terlarut awal (DO_0), sedangkan botol H3 dan H5 diinkubasi masing-masing selama 3 dan 5 hari sebelum dilakukan pengukuran kadar oksigen terlarut (DO_3 dan DO_5).

Nilai BOD_5 dihitung berdasarkan selisih kadar oksigen terlarut sebelum dan setelah inkubasi selama lima hari menggunakan faktor pengenceran dengan persamaan:

$$BOD_5 = (DO_0 - DO_5) \times f$$

dengan DO_0 adalah kadar oksigen terlarut awal (mg/L), DO_5 adalah kadar oksigen terlarut setelah inkubasi lima hari (mg/L), dan f adalah faktor pengenceran. Dalam penelitian ini digunakan faktor pengenceran sebesar 5×. Pengukuran DO dilakukan menggunakan metode titrasi iodometri dan nilai DO digunakan sebagai dasar perhitungan BOD_5, bukan sebagai parameter penelitian yang dianalisis secara terpisah. Setiap kelompok perlakuan diuji dalam dua botol pengukuran (duplo) dan hasil BOD_5 dinyatakan sebagai nilai rata-rata ± simpangan baku.

2.5. Analisis Data

Data BOD_5 disajikan sebagai nilai rata-rata ± simpangan baku (SD) dari dua pengukuran (duplo). Analisis statistik dilakukan menggunakan Microsoft Excel. Perbedaan nilai BOD_5 antarperlakuan pada masing-masing tahap pengujian dianalisis menggunakan *One-Way Analysis of Variance* (One-Way ANOVA) pada taraf signifikansi 5% ($\alpha = 0{,}05$). Apabila hasil ANOVA menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0{,}05$), analisis dilanjutkan dengan uji *Least Significant Difference* (LSD) pada taraf 5% untuk mengetahui pasangan perlakuan yang menunjukkan perbedaan nyata.

Analisis statistik dilakukan secara terpisah pada masing-masing tahap pengujian karena sampel limbah pada setiap tahap diperoleh pada waktu pengambilan yang berbeda. Dengan demikian, perbandingan statistik dilakukan antara perlakuan dan kontrol yang berasal dari batch sampel yang sama pada masing-masing tahap, sedangkan nilai BOD_5 antarbatch tidak dibandingkan secara statistik. Dua pengukuran pada setiap kelompok perlakuan berasal dari sampel limbah pada tahap pengujian yang sama dan digunakan sebagai pengukuran duplo. Nilai simpangan baku sebesar 0 menunjukkan bahwa kedua hasil pengukuran pada kelompok tersebut memiliki nilai yang sama. Penggunaan duplo dilakukan karena keterbatasan jumlah sampel dan pelaksanaan pengujian secara bertahap. Kedua pengukuran tersebut tidak merepresentasikan ulangan biologis dari batch limbah yang berbeda. Oleh karena itu, keterbatasan jumlah ulangan perlu dipertimbangkan dalam interpretasi hasil statistik, dan analisis digunakan terutama untuk menggambarkan perbedaan respons BOD_5 antarperlakuan dalam masing-masing tahap pengujian.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian dilakukan secara bertahap menggunakan sampel limbah yang diperoleh pada waktu pengambilan yang berbeda untuk setiap tahap pengujian. Pada masing-masing tahap, kelompok kontrol dan perlakuan berasal dari pengambilan sampel limbah yang sama sehingga kontrol digunakan sebagai pembanding internal terhadap perlakuan pada tahap pengujian tersebut. Perbedaan nilai BOD_5 pada kelompok kontrol antartahap pengujian menunjukkan adanya variasi karakteristik awal sampel limbah yang digunakan. Dengan pertimbangan tersebut, perbandingan efektivitas antarperlakuan tidak dilakukan berdasarkan nilai BOD_5 absolut antartahap pengujian, melainkan berdasarkan perbedaan respons antara perlakuan dan kontrol pada masing-masing tahap pengujian.

3.1. Hasil Pengukuran BOD Bioaugmentasi pada *P. aeruginosa*

Hasil pengukuran menunjukkan bahwa bioaugmentasi menggunakan *P. aeruginosa* menghasilkan nilai BOD_5 yang lebih rendah dibandingkan kontrol. Nilai BOD_5 rata-rata beserta hasil uji lanjut LSD disajikan pada Tabel 2.

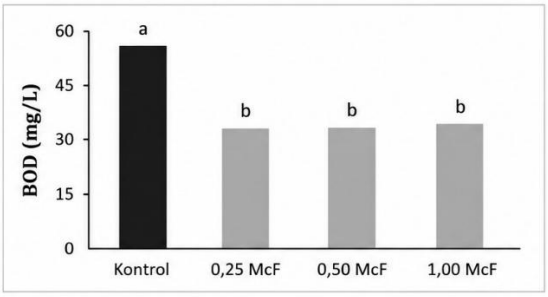
Tabel 2. Nilai BOD_5 (Mean ± SD) dan Hasil Uji LSD pada Perlakuan Bioaugmentasi *P. aeruginosa*

Perlakuan	BOD_5 (mg/L, Mean ± SD)
Kontrol	57,85 ± 0,58[a]
0,25 McF	33,21 ± 0,28[b]
0,5 McF	32,63 ± 0,03[b]
1,0 McF	32,90 ± 0,14[b]

Keterangan: *Data disajikan sebagai rata-rata ± simpangan baku (n = 2). Huruf superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata berdasarkan uji LSD pada taraf signifikansi 5% (α = 0,05).*

Berdasarkan Tabel 2, nilai BOD_5 pada perlakuan bioaugmentasi *P. aeruginosa* berkisar antara 32,63 ± 0,03 hingga 33,21 ± 0,28 mg/L, sedangkan kontrol memiliki nilai 57,85 ± 0,58 mg/L. Secara deskriptif, nilai BOD_5 terendah diperoleh pada konsentrasi 0,50 McFarland. Perbandingan nilai BOD_5 pada setiap perlakuan disajikan pada Gambar 1.

© 2026, Program Studi Ilmu Lingkungan Sekolah Pascasarjana UNDIP



Gambar 1. Perbandingan Nilai BOD_5 pada Bioaugmentasi *P. aeruginosa*

Hasil *One-Way ANOVA* menunjukkan bahwa perlakuan bioaugmentasi *P. aeruginosa* memberikan perbedaan yang signifikan terhadap nilai BOD_5 ($F = 2846{,}97$; $p = 4{,}11 \times 10^{-7}$; $p < 0{,}05$). Uji lanjut LSD menunjukkan bahwa seluruh perlakuan bioaugmentasi berbeda nyata dibandingkan kontrol. Sebaliknya, konsentrasi 0,25; 0,50; dan 1,00 McFarland tidak menunjukkan perbedaan nyata satu sama lain dan berada dalam kelompok notasi yang sama, yaitu kelompok b. Dengan demikian, pada kondisi penelitian ini, penambahan *P. aeruginosa* menghasilkan nilai BOD_5 yang lebih rendah dibandingkan kontrol, sedangkan variasi konsentrasi inokulum 0,25–1,00 McFarland tidak menghasilkan perbedaan respons BOD_5 yang nyata.

Nilai DO digunakan sebagai parameter pendukung dalam pengukuran BOD_5, dengan DO_0 dan DO_5 sebagai dasar perhitungan nilai BOD_5. Selama pengujian, nilai pH pada perlakuan *P. aeruginosa* berada pada rentang 7,15–7,37, sedangkan suhu berada pada rentang 24,6–25,4 °C. Data tersebut digunakan secara deskriptif untuk menggambarkan kondisi pengujian dan tidak dimasukkan sebagai variabel dalam analisis statistik BOD_5.

3.2. Bioaugmentasi *B. subtilis*

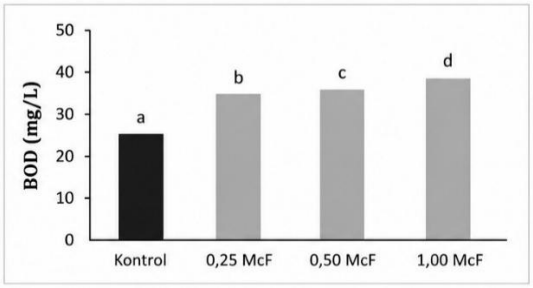
Hasil pengukuran menunjukkan bahwa seluruh perlakuan bioaugmentasi menggunakan *B. subtilis* menghasilkan nilai BOD_5 yang lebih tinggi dibandingkan kontrol pada tahap pengujian ini. Nilai BOD_5 rata-rata beserta hasil uji lanjut LSD disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Nilai BOD (Mean ± SD) dan Hasil Uji LSD pada Perlakuan Bioaugmentasi *B. subtilis*

Perlakuan	BOD_5 (mg/L, Mean ± SD)
Kontrol	$26{,}21 \pm 0{,}00^{a}$
0,25 McF	$35{,}52 \pm 0{,}03^{b}$
0,5 McF	$35{,}91 \pm 0{,}01^{c}$
1,0 McF	$37{,}22 \pm 0{,}15^{d}$

***Keterangan**: Data disajikan sebagai rata-rata ± simpangan baku (n = 2). Huruf superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata berdasarkan uji LSD pada taraf signifikansi 5% (α = 0,05).*

Berdasarkan Tabel 3, nilai BOD_5 pada perlakuan bioaugmentasi *B. subtilis* meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi inokulum, yaitu dari 35,52 ± 0,03 mg/L pada konsentrasi 0,25 McFarland menjadi 35,91 ± 0,01 mg/L pada 0,50 McFarland dan 37,22 ± 0,15 mg/L pada 1,00 McFarland. Seluruh perlakuan menunjukkan nilai BOD_5 yang lebih tinggi dibandingkan kontrol sebesar 26,21 ± 0,00 mg/L. Perbandingan nilai BOD_5 antarperlakuan disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Perbandingan Nilai BOD pada Bioaugmentasi *B. subtilis*

Hasil *One-Way ANOVA* menunjukkan bahwa perlakuan bioaugmentasi *B. subtilis* memberikan perbedaan yang signifikan terhadap nilai BOD_5 ($F = 9737{,}92$; $p = 3{,}51 \times 10^{-8}$; $p < 0{,}05$). Uji lanjut LSD menunjukkan bahwa seluruh perlakuan berbeda nyata satu sama lain, dengan kontrol berada pada kelompok notasi a, konsentrasi 0,25 McFarland pada kelompok b, 0,50 McFarland pada kelompok c, dan 1,00 McFarland pada kelompok d. Dengan demikian, pada kondisi penelitian ini, seluruh perlakuan bioaugmentasi *B. subtilis* menghasilkan nilai BOD_5 yang lebih tinggi dibandingkan kontrol, serta terdapat perbedaan respons BOD_5 yang nyata antar konsentrasi inokulum.

Nilai DO digunakan sebagai parameter pendukung dalam pengukuran BOD_5, dengan DO_0 dan DO_5 sebagai dasar perhitungan nilai BOD_5. Selama pengujian, nilai pH pada perlakuan *B. subtilis* berada pada rentang 7,25–7,44, sedangkan suhu berada pada rentang 24,6–25,4 °C. Data tersebut digunakan secara deskriptif untuk menggambarkan kondisi pengujian dan tidak dimasukkan sebagai variabel dalam analisis statistik BOD_5.

3.3. Perlakuan Molase

Hasil pengukuran menunjukkan bahwa penambahan molase menghasilkan nilai BOD_5 yang lebih tinggi dibandingkan kontrol. Nilai BOD_5 rata-rata beserta hasil uji lanjut LSD disajikan pada Tabel 4.

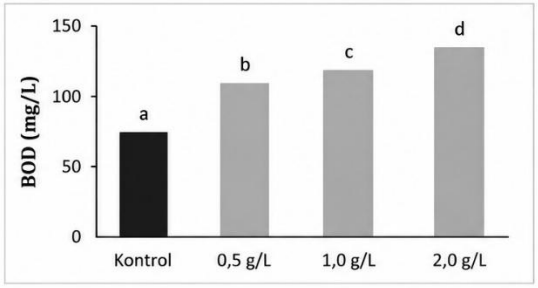
© 2026, Program Studi Ilmu Lingkungan Sekolah Pascasarjana UNDIP

Tabel 4. Nilai BOD (Mean ± SD) dan Hasil Uji LSD pada Perlakuan Penambahan Molase

Perlakuan	BOD_5 (mg/L, Mean ± SD)
Kontrol	73,71 ± 0,00[a]
0,5 g/L	113,11 ± 0,57[b]
1,0 g/L	119,95 ± 2,28[c]
2,0 g/L	136,45 ± 1,71[d]

Keterangan: *Data disajikan sebagai rata-rata ± simpangan baku (n = 2). Huruf superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata berdasarkan uji LSD pada taraf signifikansi 5% (α = 0,05).*

Berdasarkan Tabel 4, seluruh perlakuan penambahan molase menghasilkan nilai BOD_5 yang lebih tinggi dibandingkan kontrol. Nilai BOD_5 meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi molase, dengan nilai tertinggi diperoleh pada konsentrasi 2,00 g/L. Perbandingan nilai BOD_5 antarperlakuan disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Perbandingan Nilai BOD pada Perlakuan Penambahan Molase

Hasil *One-Way ANOVA* menunjukkan bahwa penambahan molase memberikan perbedaan yang signifikan terhadap nilai BOD_5 ($F = 670{,}62$; $p = 7{,}38 \times 10^{-6}$; $p < 0{,}05$). Uji lanjut LSD menunjukkan bahwa seluruh perlakuan berbeda nyata satu sama lain, dengan kontrol berada pada kelompok a, konsentrasi 0,50 g/L pada kelompok b, 1,00 g/L pada kelompok c, dan 2,00 g/L pada kelompok d. Dengan demikian, pada kondisi dan batch limbah yang digunakan pada tahap pengujian molase, setiap konsentrasi menghasilkan nilai BOD_5 yang berbeda nyata dibandingkan kontrol maupun konsentrasi lainnya.

Nilai DO digunakan sebagai parameter pendukung dalam pengukuran BOD_5, dengan DO_0 dan DO_5 sebagai dasar perhitungan nilai BOD_5.

Selama pengujian, nilai pH pada perlakuan molase berada pada rentang 5,25–7,06, sedangkan suhu berada pada rentang 25,0–25,6 °C. Data tersebut digunakan secara deskriptif untuk menggambarkan kondisi pengujian dan tidak dimasukkan sebagai variabel dalam analisis statistik BOD_5.

3.4. Perlakuan Kombinasi Molase + PA 0,5 McF

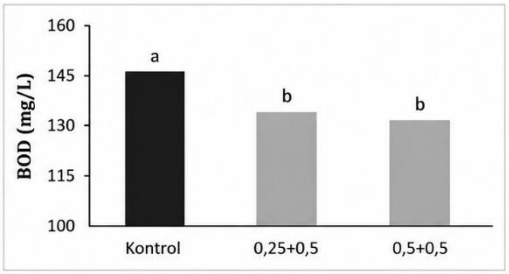
Pemilihan konsentrasi *P. aeruginosa* 0,50 McFarland pada perlakuan kombinasi didasarkan pada hasil bioaugmentasi tunggal, di mana konsentrasi tersebut menghasilkan nilai BOD_5 terendah secara deskriptif dibandingkan konsentrasi 0,25 dan 1,00 McFarland. Konsentrasi 0,50 McFarland tidak menunjukkan perbedaan nyata dengan kedua konsentrasi lainnya berdasarkan uji LSD. Molase kemudian digunakan sebagai sumber karbon tambahan untuk mengevaluasi respons BOD_5 terhadap kombinasi bioaugmentasi *P. aeruginosa* dan penambahan sumber karbon.

Tabel 5. Nilai BOD_5 (Mean ± SD) dan Hasil Uji LSD pada Perlakuan Kombinasi *P. aeruginosa* 0,5 McF + Molase

Perlakuan	BOD (mg/L) Mean ± SD
Kontrol	146,25 ± 0,58[a]
0,25 g/L+0,5 McF	133,33 ± 0,01[b]
0,5 g/L+0,5 McF	130,95 ± 1,70[b]

Keterangan: *Data disajikan sebagai rata-rata ± simpangan baku (n = 2). Huruf superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata berdasarkan uji LSD pada taraf signifikansi 5% (α = 0,05).*

Berdasarkan Tabel 5, kedua perlakuan kombinasi menghasilkan nilai BOD_5 yang lebih rendah dibandingkan kontrol. Secara deskriptif, nilai BOD_5 terendah diperoleh pada kombinasi 0,50 g/L molase + 0,50 McFarland *P. aeruginosa*. Perbandingan nilai BOD_5 antarperlakuan disajikan pada Gambar 4.



Gambar 4. Perbandingan Nilai BOD pada Perlakuan Kombinasi

Hasil analisis *One-Way ANOVA* menunjukkan bahwa perlakuan kombinasi memberikan perbedaan yang signifikan terhadap nilai BOD_5 ($F = 125{,}56$; $p = 0{,}001283$; $p < 0{,}05$). Uji lanjut LSD menunjukkan bahwa kedua perlakuan kombinasi berbeda nyata dibandingkan kontrol, tetapi tidak berbeda nyata satu sama lain. Mengacu pada notasi LSD, kontrol termasuk kelompok a, sedangkan kedua perlakuan kombinasi berada pada kelompok b. Dengan demikian, pada kondisi penelitian ini, penambahan *P. aeruginosa* 0,50 McFarland yang dikombinasikan dengan molase menghasilkan nilai BOD_5 yang berbeda nyata dibandingkan kontrol, sedangkan peningkatan konsentrasi molase dari 0,25 menjadi 0,50 g/L belum menghasilkan perbedaan BOD_5 yang signifikan.

Nilai DO digunakan sebagai parameter pendukung dalam pengukuran BOD_5, dengan DO_0 dan DO_5 sebagai dasar perhitungan nilai BOD_5. Selama pengujian, nilai pH pada perlakuan kombinasi berada pada rentang 7,31–7,70, sedangkan suhu berada pada rentang 24,9–25,1 °C. Data tersebut digunakan secara

© 2026, Program Studi Ilmu Lingkungan Sekolah Pascasarjana UNDIP

deskriptif untuk menggambarkan kondisi pengujian dan tidak dimasukkan sebagai variabel dalam analisis statistik BOD_5.

3.5. Pembahasan Umum

Hasil penelitian menunjukkan bahwa respons nilai BOD_5 berbeda pada setiap perlakuan bioaugmentasi dan penambahan sumber karbon. *P. aeruginosa* menghasilkan nilai BOD_5 lebih rendah dibandingkan kontrol pada tahap pengujian, sedangkan *B. subtilis* dan molase secara tunggal menghasilkan nilai BOD_5 lebih tinggi dibandingkan kontrol masing-masing. Perlakuan kombinasi *P. aeruginosa* 0,50 McFarland dengan molase menghasilkan nilai BOD_5 lebih rendah dibandingkan kontrol pada tahap pengujian kombinasi. Perbandingan tersebut dilakukan terhadap kontrol yang berasal dari batch sampel limbah yang sama pada masing-masing tahap pengujian. Dengan demikian, respons perlakuan dinilai berdasarkan perbedaannya terhadap kontrol internal pada tahap yang sama. Pendekatan ini diperlukan karena sampel limbah diambil pada waktu yang berbeda sehingga karakteristik awal limbah dapat berubah antartahap. Oleh karena itu, nilai BOD_5 absolut antartahap tidak digunakan sebagai dasar untuk menentukan perlakuan yang paling efektif. (Zhu *et al.*, 2024)

Perbedaan respons nilai BOD_5 antarperlakuan dapat berkaitan dengan karakteristik mikroorganisme yang ditambahkan serta interaksinya dengan komunitas mikroba yang telah terdapat dalam limbah dan kondisi lingkungan selama proses pengolahan. Menurut Zhu *et al.*, (2024), keberhasilan bioaugmentasi dipengaruhi oleh hubungan antara mikroorganisme yang ditambahkan, komunitas mikroba yang telah ada, serta kondisi abiotik yang memengaruhi kelangsungan hidup, aktivitas, dan adaptasi mikroorganisme selama proses pengolahan. Studi tersebut juga menunjukkan bahwa strategi bioaugmentasi dapat memengaruhi kinerja pengolahan dan komunitas mikroba pada limbah industri. Dalam penelitian ini, faktor-faktor tersebut tidak seluruhnya diukur secara langsung sehingga pengaruh masing-masing faktor terhadap perubahan BOD_5 tidak dapat dipastikan secara spesifik. Oleh karena itu, hasil BOD_5 digunakan untuk menggambarkan respons sistem terhadap perlakuan, bukan untuk menetapkan mekanisme biodegradasi tertentu.

Pemilihan *P. aeruginosa* sebagai salah satu mikroorganisme bioaugmentasi didasarkan pada kemampuannya dalam memanfaatkan berbagai senyawa organik dan potensinya dalam proses biodegradasi. Pada penelitian Yin *et al.*, (2024), *P. aeruginosa* digunakan untuk mengevaluasi respons BOD_5 setelah penambahan mikroorganisme pada limbah cair industri farmasi. Hasil pengujian menunjukkan bahwa seluruh konsentrasi *P. aeruginosa* menghasilkan nilai BOD_5 yang lebih rendah dibandingkan kontrol pada batch limbah yang sama.

Hasil tersebut sejalan dengan Larabi *et al.*, (2025) yang melaporkan bahwa penggunaan *P. aeruginosa* dalam pengolahan biologis air limbah dapat menurunkan BOD_5 dibandingkan perlakuan tanpa inokulum. Namun, karena karakteristik limbah dalam penelitian Larabi *et al.* berbeda dari limbah cair industri farmasi yang digunakan dalam penelitian ini, hasil tersebut digunakan sebagai pembanding mengenai potensi *P. aeruginosa*, bukan sebagai pembanding langsung terhadap kondisi penelitian.

Meskipun seluruh perlakuan *P. aeruginosa* menghasilkan BOD_5 lebih rendah daripada kontrol, konsentrasi 0,25; 0,50; dan 1,00 McFarland tidak menunjukkan perbedaan nyata satu sama lain. Dengan demikian, peningkatan konsentrasi inokulum dalam rentang yang diuji belum menghasilkan perubahan respons BOD_5 yang berbeda secara statistik. Menurut Raper *et al.*, (2018), keberhasilan bioaugmentasi tidak hanya ditentukan oleh jumlah inokulum, tetapi juga oleh kemampuan mikroorganisme untuk bertahan dan berkembang dalam sistem, ketersediaan substrat, laju pertumbuhan, serta kemungkinan terjadinya *washout*. Oleh karena itu, peningkatan konsentrasi inokulum tidak selalu menghasilkan peningkatan efektivitas pengolahan secara proporsional. Pada penelitian ini, konsentrasi 0,50 McFarland menghasilkan nilai BOD_5 terendah secara deskriptif. Namun, konsentrasi tersebut tidak dapat ditetapkan sebagai konsentrasi optimum karena tidak berbeda nyata dari konsentrasi 0,25 dan 1,00 McFarland. Oleh karena itu, pemilihan 0,50 McFarland pada perlakuan kombinasi didasarkan pada pertimbangan deskriptif, bukan pada penetapan konsentrasi optimum secara statistik.

Penurunan BOD_5 menunjukkan bahwa kebutuhan oksigen biologis yang terukur selama periode pengujian lebih rendah pada perlakuan *P. aeruginosa* dibandingkan kontrol. BOD_5 merupakan parameter agregat yang menggambarkan kebutuhan oksigen biologis selama periode pengujian dan tidak memberikan informasi spesifik mengenai senyawa organik yang mengalami degradasi (APHA, 2017). Oleh karena itu, penurunan BOD_5 dalam penelitian ini tidak dapat digunakan sebagai bukti langsung mengenai mekanisme biodegradasi, jenis senyawa yang terdegradasi, atau tingkat degradasi senyawa organik tertentu. Interpretasi tersebut juga dibatasi karena perubahan konsentrasi senyawa organik, biomassa, jumlah sel, metabolit, dan aktivitas enzim tidak diukur secara langsung.

B. subtilis digunakan sebagai mikroorganisme pembanding karena memiliki kemampuan menghasilkan berbagai enzim ekstraseluler, termasuk amilase dan protease, yang berperan dalam pemecahan senyawa organik dalam substrat limbah seperti penelitian oleh Msarah *et al.*, (2020). Penggunaan *B. subtilis* dalam penelitian ini

© 2026, Program Studi Ilmu Lingkungan Sekolah Pascasarjana UNDIP

dimaksudkan untuk mengevaluasi respons BOD_5 setelah penambahan mikroorganisme dengan karakteristik biodegradasi yang berbeda dari *P. aeruginosa*. Penelitian Kehinde *et al.*, (2022) menunjukkan bahwa penggunaan *B. subtilis* pada limbah cair industri farmasi dapat menurunkan BOD dibandingkan kondisi awal, sehingga menunjukkan potensi bakteri tersebut dalam proses pengolahan biologis limbah farmasi.

Berbeda dengan *P. aeruginosa*, seluruh konsentrasi *B. subtilis* pada penelitian ini menghasilkan nilai BOD_5 yang lebih tinggi dibandingkan kontrol dan menunjukkan kecenderungan meningkat seiring peningkatan konsentrasi inokulum. Hasil uji statistik menunjukkan bahwa setiap konsentrasi *B. subtilis* berbeda nyata satu sama lain, sehingga peningkatan konsentrasi inokulum pada rentang 0,25–1,00 McFarland menghasilkan respons BOD_5 yang berbeda pada kondisi pengujian. Pola tersebut berbeda dengan hasil bioaugmentasi *P. aeruginosa*, yang menunjukkan bahwa ketiga konsentrasi inokulum tidak berbeda nyata satu sama lain. Perbedaan pola respons tersebut menurut Raper *et al.*, (2018) menunjukkan bahwa respons terhadap bioaugmentasi tidak hanya ditentukan oleh jumlah mikroorganisme yang ditambahkan, tetapi juga dapat dipengaruhi oleh kemampuan mikroorganisme untuk bertahan dan beradaptasi terhadap lingkungan pengolahan, ketersediaan substrat, serta interaksinya dengan komunitas mikroba yang telah terdapat dalam limbah. Dengan demikian, peningkatan konsentrasi *B. subtilis* pada penelitian ini tidak secara langsung dapat diartikan sebagai peningkatan efektivitas pengolahan, karena nilai BOD_5 yang lebih tinggi menunjukkan respons kebutuhan oksigen biologis yang berbeda pada kondisi pengujian.

Perbedaan respons antara *P. aeruginosa* dan *B. subtilis* dalam penelitian ini juga perlu diinterpretasikan secara hati-hati. Meskipun secara deskriptif *P. aeruginosa* menghasilkan nilai BOD_5 yang lebih rendah sedangkan *B. subtilis* menghasilkan nilai yang lebih tinggi dibandingkan kontrol masing-masing, kedua perlakuan dilakukan pada batch limbah yang berbeda. Oleh karena itu, perbedaan tersebut belum dapat digunakan untuk menyimpulkan bahwa *P. aeruginosa* lebih efektif daripada *B. subtilis* secara umum. Perbedaan karakteristik awal limbah antartahap pengujian dapat turut memengaruhi respons BOD_5 terhadap mikroorganisme yang ditambahkan. Interpretasi penelitian ini dibatasi pada respons masing-masing mikroorganisme terhadap kontrol internal pada batch limbah yang digunakan.

Molase dipilih sebagai sumber karbon eksternal karena mengandung senyawa organik yang dapat dimanfaatkan oleh mikroorganisme sebagai substrat dalam proses biologis. Molase diketahui memiliki kandungan gula dan fraksi organik yang tinggi sehingga berpotensi menyediakan karbon yang mudah tersedia bagi mikroorganisme. Liu *and* Cheng, (2022) melaporkan bahwa molase mengandung sekitar 45% gula pereduksi dan dapat digunakan sebagai sumber karbon dalam pengolahan air limbah. Selain itu, Jaman *et al.*, (2023) menjelaskan bahwa kandungan organik dan gula yang tinggi pada molase menjadikannya substrat yang berpotensi dimanfaatkan dalam proses biologis.

Pada penelitian ini, seluruh konsentrasi molase menghasilkan nilai BOD_5 yang lebih tinggi dibandingkan kontrol dan menunjukkan kecenderungan peningkatan nilai BOD_5 seiring dengan meningkatnya konsentrasi molase yang ditambahkan. Hasil uji statistik menunjukkan bahwa seluruh perlakuan berbeda nyata satu sama lain. Peningkatan nilai BOD_5 tersebut dapat dikaitkan dengan bertambahnya beban bahan organik akibat penambahan molase. Meskipun molase dapat digunakan sebagai sumber karbon eksternal untuk mendukung proses biologis, penambahannya juga memasukkan bahan organik tambahan ke dalam sistem. Liu *and* Cheng, (2022) menunjukkan bahwa molase digunakan sebagai sumber karbon eksternal karena kandungan karbon organiknya dapat dimanfaatkan dalam proses biologis, sedangkan Jaman *et al.*, (2023) menunjukkan tingginya kandungan organik dan gula pada molase. Dengan demikian, semakin tinggi konsentrasi molase yang ditambahkan, semakin besar pula beban bahan organik yang masuk ke dalam sistem dan berpotensi meningkatkan kebutuhan oksigen biologis yang terukur sebagai BOD_5.

Hasil tersebut menunjukkan bahwa penggunaan sumber karbon eksternal tidak selalu menghasilkan penurunan BOD_5 apabila sumber karbon tersebut diberikan tanpa strategi pengolahan yang secara khusus mengevaluasi penghilangan bahan organik. Pada penelitian ini, molase diberikan secara tunggal sehingga kontribusi bahan organik yang berasal dari molase terhadap nilai BOD_5 menjadi bagian dari respons yang terukur. Oleh karena itu, penelitian Rodrigues *et al.*, (2024) menjelaskan bahwa penambahan molase secara tunggal tidak menunjukkan efek penurunan BOD_5, tetapi justru menghasilkan nilai BOD_5 yang lebih tinggi dibandingkan kontrol. Nilai tersebut tidak dapat secara langsung diinterpretasikan sebagai peningkatan atau penurunan efektivitas biodegradasi, karena BOD_5 yang terukur mencerminkan kebutuhan oksigen biologis dari keseluruhan bahan organik dalam sistem, termasuk bahan organik yang ditambahkan melalui molase. Hasil penambahan molase secara tunggal yang menghasilkan peningkatan BOD_5 menjadi dasar untuk mengevaluasi respons ketika molase diberikan bersama *P. aeruginosa*. Pada tahap kombinasi, *P. aeruginosa* 0,50

© 2026, Program Studi Ilmu Lingkungan Sekolah Pascasarjana UNDIP

McFarland dipilih berdasarkan hasil bioaugmentasi tunggal yang menunjukkan nilai BOD_5 terendah secara deskriptif. Namun, konsentrasi tersebut tidak menunjukkan perbedaan nyata dengan konsentrasi 0,25 dan 1,00 McFarland, sehingga pemilihannya tidak didasarkan pada penetapan konsentrasi optimum secara statistik.

Berbeda dengan penambahan molase secara tunggal, perlakuan kombinasi *P. aeruginosa* dengan molase menghasilkan nilai BOD_5 yang lebih rendah dibandingkan kontrol internal pada batch kombinasi. Pola ini menunjukkan respons yang berbeda antara penambahan molase secara tunggal dan kombinasi dengan *P. aeruginosa*. Perbedaan tersebut dijelaskan juga oleh Calvina *et al.*, (2024) kemungkinan berkaitan dengan keberadaan mikroorganisme yang ditambahkan dan ketersediaan substrat tambahan dari molase. Molase dapat menyediakan sumber karbon yang dapat dimanfaatkan oleh mikroorganisme dalam proses biologis. Martini *et al.*, (2023) melaporkan penggunaan *soy molasses* sebagai substrat fermentasi untuk *P. aeruginosa* ATCC 10145, yang menunjukkan bahwa molase dapat dimanfaatkan oleh bakteri tersebut sebagai sumber substrat dalam proses biologis. Penggunaan molase sebagai sumber karbon eksternal juga telah dilaporkan dalam pengolahan biologis air limbah. Penelitian Ignatowicz *and* Smyk, 2020; Bernat *et al.*, (2021) menunjukkan bahwa penambahan molase sebagai sumber karbon eksternal dapat meningkatkan fraksi senyawa organik yang mudah terbiodegradasi dalam air limbah, sehingga dapat mendukung proses biologis.

Namun, kemungkinan adanya pengaruh gabungan tersebut belum dapat dipastikan berdasarkan penelitian ini, karena biomassa, jumlah sel, konsumsi substrat, perubahan COD, maupun aktivitas metabolik tidak diukur secara langsung. Oleh karena itu, hasil penelitian ini belum dapat digunakan sebagai bukti langsung terjadinya sinergi atau peningkatan aktivitas biodegradasi akibat kombinasi *P. aeruginosa* dan molase. Penurunan BOD_5 pada perlakuan kombinasi lebih tepat diinterpretasikan sebagai respons sistem terhadap pemberian *P. aeruginosa* dan molase pada batch limbah yang digunakan, bukan sebagai bukti mekanisme sinergistik tertentu. Konsentrasi molase 0,25 dan 0,50 g/L juga tidak menunjukkan perbedaan nyata, sehingga peningkatan konsentrasi molase dalam rentang tersebut belum dapat dinyatakan meningkatkan efektivitas perlakuan kombinasi.

Perbandingan dengan perlakuan molase tunggal perlu dilakukan secara hati-hati karena kedua tahap menggunakan batch limbah yang berbeda. Variasi nilai BOD_5 kontrol pada kedua tahap menunjukkan adanya perbedaan karakteristik awal limbah antarwaktu pengambilan. Oleh karena itu, hasil perlakuan kombinasi tidak dapat digunakan untuk menyimpulkan bahwa kombinasi *P. aeruginosa*–molase secara absolut lebih efektif daripada molase tunggal. Interpretasi yang lebih tepat adalah bahwa pada batch limbah yang digunakan dalam tahap kombinasi, pemberian *P. aeruginosa* bersama molase menghasilkan respons BOD_5 yang lebih rendah dibandingkan kontrol internalnya. Interpretasi hasil penelitian perlu mempertimbangkan bahwa sampel limbah pada setiap tahap pengujian diambil pada minggu yang berbeda, sehingga karakteristik awal limbah dapat berubah. Namun, kontrol dan perlakuan pada setiap tahap berasal dari batch limbah yang sama sehingga kontrol digunakan sebagai pembanding internal. Selain itu, penggunaan dua pengukuran (duplo) membatasi kekuatan statistik karena tidak merepresentasikan ulangan biologis dari batch yang berbeda.

BOD_5 sebagai satu-satunya indikator juga belum cukup untuk memastikan mekanisme biodegradasi secara langsung. Tidak adanya pengukuran COD, biomassa, dan jumlah sel menyebabkan perubahan BOD_5 belum dapat dikaitkan secara pasti dengan perubahan beban bahan organik atau aktivitas mikroorganisme. Kondisi inkubasi tanpa aerasi aktif dengan pertukaran udara pasif juga perlu dipertimbangkan karena dapat memengaruhi ketersediaan oksigen selama pengujian. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *P. aeruginosa* berpotensi sebagai agen bioaugmentasi untuk menurunkan BOD_5 pada kondisi pengujian. Namun, penerapannya pada skala IPAL masih memerlukan optimasi dosis inokulum, aerasi, kemampuan adaptasi mikroorganisme, karakteristik limbah, dan kebutuhan sumber karbon. Penelitian lanjutan dengan replikasi yang lebih kuat serta pengukuran COD, DO, biomassa atau jumlah sel diperlukan untuk memperkuat evaluasi efektivitas dan menentukan kondisi operasional sebelum diterapkan pada skala IPAL.

4. KESIMPULAN

Jenis perlakuan menghasilkan respons BOD_5 yang berbeda pada limbah cair industri farmasi. Bioaugmentasi *P. aeruginosa* menghasilkan BOD_5 lebih rendah dibandingkan kontrol, sedangkan variasi konsentrasi 0,25–1,00 McFarland tidak menunjukkan perbedaan nyata. Bioaugmentasi *B. subtilis* dan penambahan molase secara tunggal menghasilkan BOD_5 lebih tinggi dibandingkan kontrol masing masing. Perlakuan kombinasi *P. aeruginosa* 0,50 McFarland dengan molase menghasilkan BOD_5 lebih rendah dibandingkan kontrol pada batch pengujian kombinasi, tetapi konsentrasi molase 0,25 dan 0,50 g/L tidak menunjukkan perbedaan nyata. Berdasarkan kondisi dan desain penelitian, *P. aeruginosa* menunjukkan potensi menghasilkan respons penurunan BOD_5, tetapi efektivitas antarjenis perlakuan tidak dapat dibandingkan secara langsung berdasarkan nilai BOD_5 absolut karena setiap tahap menggunakan batch sampel limbah yang berbeda.

© 2026, Program Studi Ilmu Lingkungan Sekolah Pascasarjana UNDIP

DAFTAR PUSTAKA

Almutairi, M. (2020) 'Method development for evaluating the effectiveness of hydrocarbons on BOD, UBOD and COD removal in oily wastewater.', journal of the International Association on Water Pollution Research, 12(81), pp. 1–15. Available at: https://doi.org/10.2166/wst.2020.324.

APHA (2017) 'Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater Part 1000 Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater', American Public Health Association [Preprint].

Bernat, K. et al. (2021) 'Post-Treatment of the Effluent from Anaerobic Digestion of the Leachate in Two-Stage SBR System Using Alternative Carbon Sources', Sustainability, 13(6297), pp. 1–12. Available at: https://doi.org/10.3390/su13116297

Bhakti, T.S. et al. (2023) 'Total Plate Number Test at 0.5 McFarland Standard in Escherichia coli Culture', Bioma : Berkala Ilmiah Biologi, 25(2), pp. 1–4. Available at: https://doi.org/10.14710/bioma.25.2.94-97.

Calvina, A.B. et al. (2024) 'Bioremediasi Cemaran Tanah Menggunakan Biostimulant Bioremediation of Soil Contamination Using Biostimulants', Camellia, 3(2), pp. 192–204. Available at: https://journal.um-surabaya.ac.id/CAM/article/view/24664.

Chuda, A., Otlewska, A., & Ziemiński, K. (2023) 'Insights into the microbial community structure in the biodegradation process of high-strength ammonia digestate liquid fraction in conventional activated sludge system.' Available at: https://doi.org/10.15376/biores.18.2.3540-3559

Dai, W. et al. (2023) 'Study on the removal characteristics and degradation pathways of highly toxic and refractory organic pollutants in real pharmaceutical factory wastewater treated by a pilot-scale integrated process', Frontiers in Microbiology, 14, pp. 1–22. Available at: https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1128233.

Dias, C. et al. (2020) 'Concomitant wastewater treatment with lipid and carotenoid production by the oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides grown on brewery effluent enriched with sugarcane molasses and urea', Process Biochemistry, 94(January), pp. 1–14. Available at: https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.03.015.

Edokpayi, J.N. et al. (2017) 'Household Hazardous Waste Management in - Impact of Wastewater on Surface Water Quality in sub-Saharan Africa Developing Countries : A Case Study of South Africa', Water Quality domestic [Preprint]. Available at: http://dx.doi.org/10.5772/66561.

Ignatowicz, K. and Smyk, J. (2020) 'The Influence of a Selected External Carbon Source on the Share of COD Fractions and the Speed of Denitrification Processes', Journal of Ecological Engineering, 21(8), pp. 57–63. Available at: https://doi.org/10.12911/22998993/127255.

Jaman, K. et al. (2023) 'Influence of Molasses Residue on Treatment of Cow Manure in an Anaerobic Filter with Perforated Weed Membrane and a Conventional Reactor : Variations of Organic Loading and a Machine Learning Application', Membranes, 13(159), pp. 1–23.

Kehinde, L.I. et al. (2022) 'Bioremediation of Waste Water from Pharmaceutical Industry by Bacteria (*Bacillus subtilis*)', Journal of Environmental Issues and Climate Change, 1(1), pp. 38–50. Available at: https://doi.org/10.59110/jeicc.v1i1.64

Khalidi-Idrissi, A. et al. (2023) 'Recent advances in the biological treatment of wastewater rich in emerging pollutants produced by pharmaceutical industrial discharges', International Journal of Environmental Science and Technology, pp. 1–22. Available at: https://doi.org/10.1007/s13762-023-04867-z.

Larabi, B. et al. (2025) 'Biological treatment of fish pond wastewater using selected bacteria in laboratory - scale batch culture : a case study of a farm in Taghit, Bechar (Southwestern Algeria)', Applied Water Science, 15(9), pp. 1–15. Available at: https://doi.org/10.1007/s13201-025-02597-w.

Liu, C. and Cheng, K. (2022) 'Molasses fermentation to produce low-cost carbon source for denitrification', Biotechnology & Biotechnological Equipment, 36(1), pp. 878–890. Available at: https://doi.org/10.1080/13102818.2022.2138781.

Maddah, H.A. (2022) 'Predicting Optimum Dilution Factors for BOD Sampling and Desired Dissolved Oxygen for Controlling Organic Contamination in Various Wastewaters', International Journal of Chemical Engineering, 2022, pp. 1–14. Available at: https://doi.org/10.1155/2022/8637064.

Martini, L. et al. (2023) 'Optimization and characterization of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 using molasses as a substrate', World Journal of Microbiology and Biotechnology, 39(2), pp. 1–11. Available at: https://doi.org/10.1007/s11274-022-03494-z.

Msarah, M.J. et al. (2020) 'Heliyon Optimisation and production of alpha amylase from thermophilic Bacillus spp. and its application in food waste biodegradation', Heliyon, 6(6), p. e04183. Available at: https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04183.

Raper, E., Stephenson, T., Anderson, D. R., Fisher, R. and Soares, A. (2018) 'Industrial wastewater treatment through bioaugmentation', Process Safety and Environmental Protection, 118(August), pp. 178–187. Available at: https://doi.org/10.1016/j.psep.2018.06.035.

Shah, S.M. et al. (2025) 'Indigenous bacteria as potential agents for trace metal remediation in industrial wastewater', Scientific Reports, 15(13141), pp. 1–22. Available at: https://doi.org/10.1038/s41598-025-97711-y

Yin, C. et al. (2024) 'Advances in Development of Novel Therapeutic Strategies against Multi-Drug Resistant *Pseudomonas aeruginosa*', Antibiotics, 13(2). Available at: https://doi.org/10.3390/antibiotics13020119.

Zhu, C. et al. (2024) 'A Bio-Enhanced Treatment Strategy for Tannery Wastewater Based on Progressive Activation of Microbial Agents', Journal of Water Process Engineering, 67. Available at: https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2024.106087.

© 2026, Program Studi Ilmu Lingkungan Sekolah Pascasarjana UNDIP