

4. PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, diproduksi bir dengan bahan baku *extract malt barley*, *grits* jagung, bunga *hops* dengan menggunakan *Saccharomyces uvarum* sebagai mikroorganisme yang berperan selama proses fermentasi. *Saccharomyces uvarum* merupakan salah satu *yeast* dalam *genus Saccharomyces* yang biasa digunakan dalam proses fermentasi makanan dan minuman, mempunyai peranan dalam proses degradasi substrat untuk membentuk struktur, tekstur serta aroma yang dapat menambah nilai gizi. Sumerta & Kanti (2017), menerangkan pula, *genus Saccharomyces* juga dapat mengonversi kandungan gula dalam substrat menjadi produk *ethanol* dan karbondioksida sehingga baik digunakan sebagai starter dalam pembuatan minuman beralkohol khususnya bir. Penelitian ini berfokus pada karakteristik fisiko-kimiawi, mikrobiologi dan sensori dari bir yang diberi *adjuncts* berupa *grits* jagung dalam berbagai perbandingan (0%, 10% dan 15%). Analisis fisiko-kimiawi yang dilakukan meliputi analisis warna (EBC dan SRM), kekeruhan (NTU), derajat keasaman, kandungan gula ($^{\circ}\text{Brix}$), aktivitas antioksidan, *ethanol* dan *methanol*. Analisis mikrobiologi meliputi *Total Plate Count* (TPC) terhadap keberadaan *yeast* dan *viabilitas yeast* sebelum dan sesudah proses fermentasi. Sedangkan analisis sensori ditujukan untuk mendapatkan 1 formulasi terbaik berdasarkan tingkat kesukaan panelis menggunakan metode uji *ranking hedonic* dengan atribut yang dinilai antara lain, warna, aroma, rasa, *bitterness*, *aftertaste* dan *overall*.

4.1. Analisis Fisik

4.1.1. Warna

Penampilan visual khususnya warna produk minuman, mempunyai keterikatan yang kuat dengan tingkat keberterimaan produk oleh konsumen (Carvalho, *et al.*, 2017). Oleh karenanya, dalam proses *brewing beer* sering ditambahkan *adjuncts* dengan tujuan untuk memperbaiki kualitas bir. Penambahan *grits* jagung manis sebagai *adjuncts* dapat memperbaiki kualitas warna bir karena adanya komponen karotenoid. Karotenoid pada *grits* jagung manis merupakan komponen alami yang banyak ditemukan pada produk jagung

dalam bentuk pigmen berwarna kuning yang banyak didapati pada bagian *endosperm* jagung (Rouf Shah *et al.*, 2016).

Pengukuran warna pada produk bir biasa menggunakan skala EBC (*European Beer Color*) atau SRM (*Standard Reference Method*) dengan metode *spectrophotometer*. Prinsip kerja *spectrophotometer* sendiri adalah dengan memantulkan cahaya *monochromatic* pada sebuah larutan, dan banyaknya cahaya yang diserap akan menunjukkan intensitas warna suatu larutan. Menurut White (1995), pengukuran warna bir *malt* yang sesuai digunakan panjang gelombang 430 nm. Dalam pembacaan skala EBC, nilai absorbansi yang didapatkan dikonversikan dengan faktor/angka pengali 25. Faktor/angka pengali 25 ini didasarkan pada *Standar Hartong Solution*, dimana pada panjang jalur sampel 25 mm ukuran sel pada produk bir dapat dihitung. Ketebalan sel pada ukuran 25 mm sebanding pula dalam pembacaan skala warna dalam unit EBC. Selain dengan unit EBC, warna bir dapat direpresentasikan dengan skala pengukuran SRM. Pengukuran SRM ini ditetapkan oleh Joseph Williams Lovibond, dengan mengalikan unit EBC dengan faktor/angka pengali 1,97. White, (1995) menambahkan pula, meskipun nilai skala yang nantinya ditunjukkan berbeda, namun kedua *unit* ini akan memiliki rentang skala warna yang sama. Rentang nilai EBC adalah 0-80, sedangkan rentang nilai SRM adalah 0-40. Rentang warna EBC dan SRM dimulai dari warna kuning keemasan (semakin kecil nilai) hingga kecoklatan (semakin besar nilai). Ilustrasi rentang warna bir *adjuncts grits* jagung dapat dilihat melalui pada Gambar 12 dan 13.

Nilai EBC dan SRM pada produk bir *adjuncts grits* jagung menunjukkan adanya perbedaan nyata baik antar formulasi yang ada (0%, 10% dan 15%), maupun antar sampel (*cold wort*, *day 1 fermentation*, *day 9 fermentation* dan *finish product*) (berdasarkan Tabel 5.) Berdasarkan formulasi yang ada (0%, 10% dan 15%), B1 memiliki nilai EBC dan SRM tertinggi bila dibandingkan dengan B3 dan B4. Semakin tinggi nilai EBC maupun SRM mengimplementasikan warna semakin gelap. Formulasi B4 memiliki nilai EBC dan SRM terendah yang berarti warna produk bir yang dihasilkan semakin terang. Poreda *et al.*, (2014) menjelaskan bahwa penambahan *grits* jagung dalam proses *brewing beer* akan meningkatkan kualitas penampakan warna bir. Pada formulasi B3 dan B4 ditambahkan *grits* jagung, dimana

penambahan *grits* jagung sebagai *adjuncts* akan memperbaiki penampakan bir karena adanya pigmen kuning dari komponen karotenoid yang banyak ditemui pada *endosperm* jagung manis (Rouf Shah *et al.*, 2016). Oleh karenanya, semakin banyak presentase *grits* jagung ditambahkan sebagai *adjuncts*, maka warna bir yang dihasilkan akan semakin terang (kuning hingga kuning keemasan) bila dibandingkan dengan formulasi B1 yang hanya menggunakan *extract malt barley*. Penggunaan tunggal bahan baku *malted cereals (extract malt barley)* akan membuat penampakan warna bir semakin gelap. Hal ini didukung oleh pernyataan (Agu *et al.*, 2008) yang menjelaskan bahwa proses pengeringan *barley* dalam proses *malting* akan mempengaruhi pigmen *cereals* yang dihasilkan. Semakin tinggi suhu pengeringan dan semakin lama waktu pengeringan *cereals* maka semakin pekat warna pigmen yang dihasilkan.

Berbeda halnya dengan formulasi, apabila dibandingkan antar sampel (*cold wort, day 1 fermentation, day 9 fermentation* dan *finish product*) tiap formulasi, sampel *cold wort* memiliki nilai EBC dan SRM paling tinggi. Namun, nilai EBC dan SRM mengalami penurunan selama proses fermentasi. Penurunan nilai EBC dan SRM ini dikarenakan selama proses fermentasi terjadi beberapa perubahan struktur padatan tersuspensi, serta pigmen karotenoid yang terintegrasi (Cerrillo *et al.*, 2014). Kunze (2004) menambahkan pula, perubahan warna terjadi karena adanya penurunan pH selama proses fermentasi sehingga warna produk bir menjadi 3 unit EBC lebih terang dibandingkan dengan sampel hari pertama fermentasi. Selain karena penurunan pH, adanya proses adsorpsi zat berwarna pada sel *yeast* juga proses pengendapan *yeast* pada bagian bawah fermentor, menyebabkan warna bir yang dihasilkan akan semakin terang.

Kualitas warna *finish product* bir pada penelitian ini (0%, 10% dan 15%) bila dibandingkan dengan produk komersial dengan bahan baku pembuatan sama dengan bahan baku penelitian, didapati perbedaan yang nyata. Bir dengan formulasi penambahan *adjuncts grits* jagung terbesar (B4) memiliki nilai skala warna EBC maupun SRM yang paling mendekati bir komersial yakni dengan rentang nilai EBC ($10,62 \pm 0,68$) dan SRM ($5,39 \pm 0,34$). Meskipun demikian, seluruh formulasi bir pada penelitian ini (0%, 10% dan 15%) memenuhi standar

mutu bir *pilsener* menurut *Brewers Association* (Lampiran 1., Tabel 16). Namun untuk standar mutu bir *pilsener* menurut SNI, belum didapati kriteria uji warna bir (Lampiran 1., Tabel 17), sehingga belum dapat dipastikan bir yang diproduksi pada penelitian ini sesuai dengan syarat mutu SNI.

4.1.2. Kekeruhan

Kekeruhan pada produk bir lebih dikenal dengan istilah *haziness* atau *cloudiness*. *Haziness* pada produk bir merupakan salah satu penampilan visual yang dapat mempengaruhi kelayakan pada produk bir. Salah satu komponen yang berpengaruh pada kekeruhan bir adalah kandungan protein dalam bahan baku (Kunze, 2004). Protein mempunyai peranan penting dalam pembentukan *foam* dan *haziness* pada bir, namun juga memiliki fungsi sebagai sumber nutrisi bagi pertumbuhan *yeast*. Kunze (2004), menjelaskan pula bahwa kemampuan protein dalam membentuk ikatan dengan polifenol maupun *tannin* yang bersifat reaktif dalam proses *brewing beer*, dimana semakin banyak polifenol dan *tannin* yang bereaksi akan menghasilkan produk bir dengan kekeruhan yang sangat tinggi.

Malt barley merupakan modifikasi *barley*, dimana selama proses *malting* banyak enzim pemecah pati pada *barley* menjadi aktif, dimana komponen penyusun enzim ini adalah protein. Phieter, *et al.*, (2020) menegaskan bahwa dalam *malt barley* memiliki kandungan protein tertinggi bila dibandingkan dengan biji-bijian lainnya (*barley*, *sorghum*, dan jagung) yakni terkandung sebesar 234 IU/mg protein, yang didalamnya termasuk enzim β -amilase, enzim α -amilase dan enzim α -glucosidase. Sedangkan pada jagung sendiri mengandung 20-52 IU/mg protein yang didalamnya termasuk enzim α -amilase. Sehingga, semakin banyak digunakan *malt barley* dalam proses *brewing* tanpa adanya penambahan *adjuncts* akan menghasilkan *wort* dengan kekeruhan lebih tinggi bila dibandingkan dengan *wort* yang menggunakan *adjuncts* terlebih jagung dalam proses *brewing*. Berdasarkan Tabel 7., *cold wort* formulasi B4 memiliki nilai kekeruhan paling kecil dibandingkan dengan formulasi B3 dan B1. Penambahan jagung sebagai *adjuncts* pada formulasi B4 merupakan formulasi dengan penambahan *adjuncts* terbesar yakni 15%, diikuti dengan formulasi B3 sebesar 10%

dan B1 tanpa penambahan *adjuncts*, berdasarkan pengukuran menggunakan *turbidimeter* (NTU).

Haziness pada bir tidak hanya dikarenakan kandungan protein, namun fase tumbuh kembang *yeast* juga dapat menjadi salah satu faktor yang mempengaruhi. Bir *Pilsener* dalam proses fermentasi menggunakan *yeast* tipe *bottom fermentation*, dimana pada akhir fermentasi *yeast* akan mengendap pada dasar permukaan fermentor (Kunze, 2004). Maka dari itu, pada Tabel 7., menunjukkan selama proses fermentasi berlangsung, kekeruhan bir menurun pada semua formulasi (B1, B3 dan B4). Nilai kekeruhan paling kecil pada setiap formulasi didapati pada sampel *finish product*, dimana produk akhir bir selain sudah melewati fase pengendapan dan pematangan bir, produk akhir bir yang siap disensorikan juga melewati tahapan penyaringan menggunakan *diatomic dicalite/kieselguhr*. Proses penyaringan ini menjadi penting oleh karena melalui proses ini padatan tersuspensi seperti protein dan partikel organik, serta sisa *yeast* dapat tersaring sehingga didapatkan bir yang lebih jernih dan lebih stabil terhadap perubahan warna (Anonim, 2014^b). Berdasarkan Tabel 7., nilai kekeruhan *finish product* bir pada setiap formulasi penelitian utama jauh lebih tinggi bila dibandingkan dengan produk komersial. Namun nilai kekeruhan bir rasio *grits* jagung dengan *extract malt barley* memiliki kenampakan yang jernih yang dapat dilihat melalui Tabel 6., dimana penampakan bir yang jernih sudah memenuhi standar mutu bir *Pilsener* (Lampiran 1., Tabel 17.), sekalipun standar mutu menurut *Brewers Association* belum memiliki tetapan satuan pengukuran yang baku. Namun untuk standar mutu bir *pilsener* menurut SNI, belum didapati kriteria uji kekeruhan (Lampiran 1., Tabel 17), sehingga belum dapat dipastikan bir yang diproduksi pada penelitian ini sesuai dengan syarat mutu SNI.

4.2. Analisis Kimia

4.2.1. Derajat Keasaman (pH)

Proses penting dalam fermentasi bir adalah konversi gula *wort* menjadi bentuk etanol dan karbon dioksida (CO₂). Sedangkan tahapan utama dalam proses *brewing* bir adalah fermentasi itu sendiri serta maturasi (pematangan bir). Kedua tahapan ini sangat memiliki

peranan yang sangat penting karena merupakan proses yang *continuous* (Kunze, 2004). Selama proses konversi gula *wort*, etanol dan karbon dioksida bukan menjadi hal utama yang perlu diperhatikan, namun *by-products* fermentasi juga dapat menjadi perhatian khusus. *By-products* adalah produk lain fermentasi bir selain etanol dan karbon dioksida (CO₂) yang banyak dihasilkan oleh *yeast*, dimana *by-product* ini memiliki pengaruh terhadap karakteristik bir termasuk didalamnya derajat keasaman bir (pH).

Penggunaan bahan baku *grits* jagung berpengaruh pada pH yang dihasilkan pada tiap formulasi (B1, B3 dan B4) dapat dilihat melalui Tabel 8. Semakin banyak presentase *grits* jagung ditambahkan, maka pH yang dihasilkan akan semakin rendah. Formulasi B4, dengan penambahan *grits* jagung sebanyak 15% menghasilkan nilai pH paling rendah pada setiap sampel yang ada dibandingkan dengan formulasi B1 dan B3. Bravi *et al.*, (2014) menjelaskan penurunan pH pada produk bir salah satunya dikarenakan oleh adanya kandungan *fatty acid* (asam linolenat, asam oleat dan asam palmatat). Pada *malt* hanya terkandung asam linolenat (lebih dari 50%), sedangkan pada *grits* jagung terkandung asam linoleat (43,7%), asam oleat (46,6%) dan asam palmatat (6,6%). Oleh karenanya, pada sampel *cold wort* formulasi B4 memiliki pH paling rendah ($5,62 \pm 0,02$) bila dibandingkan dengan B3 ($5,68 \pm 0,01$) dan B1 ($5,72 \pm 0,01$). Namun, selama proses fermentasi, asam linoleat akan terus berkurang sebab akan digunakan untuk metabolisme *yeast*, dengan presentasi akhir *fatty acid* pada produk bir *all-malt* 25,3%-45,5% dan produk bir *grits* jagung 2,3%-70,8% (Bravi *et al.*, 2014). Hal ini bersesuaian dengan produk akhir bir pada penelitian ini, formulasi B1 memiliki pH paling tinggi dibandingkan dengan B3 dan B4. Namun untuk memastikan seberapa besar pengaruh komposisi *fatty acid* terhadap pH yang dihasilkan diperlukan penelitian lebih lanjut dengan metode yang jauh valid.

Asam amino dan nukleotida merupakan salah satu *by-products* fermentasi bir yang dihasilkan sebagai bentuk adaptasi *yeast* pada saat proses *pitching*. *Pitching yeast* adalah proses pencampuran *yeast* dalam *cold wort*. Saat *yeast* ditambahkan dalam *wort*, *yeast* akan menghasilkan kedua komponen tersebut yang akan berakibat pada turunnya pH *wort* karena asam-asam organik yang dihasilkan (Kunze, 2004). Oleh karenanya, berdasarkan Tabel 8.,

teramati adanya penurunan pH dari sampel *cold wort* pada setiap formulasi yang ada (0%, 10% dan 15%) dengan penurunan pH yang terjadi mempunyai rentang 0,4-0,5. Kunze (2004) menambahkan juga bahwa pH akan aktif turun pada proses fermentasi terlebih pada fase pertumbuhan awal (*logarithmic phase*). Penurunan pH selama fermentasi disebabkan oleh pembentukan berbagai asam organik melalui proses deaminasi serta pelepasan ion-ion hidrogen (H^+) akibat penguraian kalium oleh *yeast*. Setelah mengalami proses fermentasi selama 9 hari, pH tidak lagi mengalami penurunan (pH konstan). pH akhir bir yang baik memiliki rentang nilai 4,2-4,4 (Kunze, 2004). Apabila nilai pH didapati lebih dari 4,4 maka akan berakibat pada ketidakstabilan presipitasi protein dan *polyphenols* kompleks yang dapat mempengaruhi proses maturasi bir dan cita rasa bir yang dihasilkan menjadi masam akibat adanya pengasaman biologis oleh mikroba kontaminan. Pada Tabel 8., pH akhir bir yang dihasilkan pada setiap formulasi (B1, B3 dan B4) memiliki rentang nilai pH 4,5, dimana nilai yang dihasilkan sudah sesuai dengan standar mutu SNI (3-5), meskipun belum memenuhi standar sesuai dengan teori yang ada. Hal ini akan sangat berpengaruh pada cita rasa (*flavour*) akhir yang dihasilkan dari produk bir rasio *grits* jagung dan *extract malt barley*.

4.2.2. Kadar Gula ($^{\circ}Brix$)

Gula dari *wort* merupakan sumber karbon utama untuk pertumbuhan *yeast*. Dalam *wort* harus mengandung maltosa, maltotriosa dan glukosa yang bersumber dari *malt*, sebab ketiga kandungan gula ini akan berperan aktif dalam proses fermentasi *yeast*. Maltosa, maltotriosa dan glukosa ini merupakan hasil konversi pati dalam bentuk *fermentable sugar* melalui proses *mashing*. Selama pementukan *fermentable sugar* ini sangat bergantung pada enzim-enzim yang memecah gula kompleks menjadi sederhana yakni maltase, α -amilase dan β -amilase. Kedua enzim ini akan memotong rantai panjang pati menjadi gugus gula sederhana (Anonim, 2014^a). Anonim (2014^a) menambahkan enzim maltase memiliki aktivitas paling rendah, β -amilase akan memotong setiap dua gugus gula sedangkan α -amilase akan memotong rantai secara acak dengan aktivitas enzim yang paling tinggi. Namun keberadaan α -amilase perlu diperhatikan, sebab enzim ini akan banyak menghasilkan gula dextrin yang tidak dapat difermentasikan serta gula ini banyak dihasilkan pada gula berantai cabang (*amylopectin*) (Kunze, 2004).

Kandungan *fermentable sugar* sangat dipengaruhi oleh konversi gula selama proses *mashing*, dimana pada proses ini sangat bergantung pada komposisi gula kompleks yang terkandung pada bahan baku. Pada penelitian ini digunakan *extract malt barley* dan *grits* jagung, dimana jagung memiliki pati lebih tinggi dibandingkan *barley* yang disimpan pada *endosperm*. (Anonim, 2010) menjelaskan pati jagung terkandung 71-73% *amylopectin* dan 22-27% *amylose*, sedangkan pada *barley* terkandung 75% *amylopectin* dan 25% *amylose*. Sehingga penggunaan jagung sebagai *adjuncts* dapat digunakan untuk meningkatkan kandungan *fermentable sugar* pada *wort*. Namun pada Tabel 9., kandungan gula pada formulasi B1 jauh lebih tinggi dibandingkan dengan B3 dan B4. Hal ini dapat disebabkan oleh kurang maksimalnya proses *mashing* akibat aktivitas enzim yang ada, mengingat ketersediaan enzim yang berperan dalam *mashing* banyak didapatkan pada bahan *malt barley*. Selain karena aktivitas enzim, suhu dan durasi *mashing* hingga *filtrasi wort* dapat mempengaruhi kandungan *fermentable sugar* yang didapatkan (Anonim, 2014^d).

Selama proses 9 hari fermentasi *wort*, *fermentable sugar wort* akan terus menurun. Penurunan ini dapat dilihat melalui Tabel 9., dimana dalam waktu 9 hari terjadi penurunan sebanyak 5 °*brix*. Penurunan ini dikarenakan adanya aktivitas *Saccharomyces uvarum* dalam mengonversi gula *wort* menjadi produk *ethanol* dan karbon dioksida sebagai hasil fermentasi bir. Pada hari kesembilan hingga proses maturasi bir tidak didapati penurunan gula akibat aktivitas *yeast* yang semakin menurun, sehingga gula yang masih tersisa disebut *apparent extract* yang memiliki peranan sebagai *body beer* dan *mouthfeel* pada *finish product beer* (Kunze, 2004). *Finish product* bir yang dihasilkan, formulasi B3 dan B4 memiliki kandungan *apparent extract* yang tidak berbeda nyata bila dibandingkan dengan formulasi B1 dengan kandungan *apparent extract* yang jauh lebih tinggi. Kecepatan fermentasi *yeast Saccharomyces uvarum* pada *wort* dengan kandungan *fermentable sugar* lebih tinggi jauh lebih cepat dibandingkan dengan kandungan *fermentable sugar* yang lebih rendah. Seperti pada Tabel 9., kecepatan fermentasi tertinggi pada formulasi B1 dan formulasi B3 dan B4 tidak memiliki perbedaan yang nyata. Perlunya penambahan *adjuncts* dalam bentuk sukrosa cair guna memaksimalkan proses pemecahan gula oleh *yeast*. Pada penelitian ini dilakukan pengukuran kecepatan fermentasi berdasarkan penurunan gula selama 9 hari yang

dibandingkan dengan lamanya fermentasi yakni selama 9 hari. Heineken (2014) menjelaskan, bahwa pengukuran terbaik dilakukan setelah 5 hari fermentasi, sebab *yeast* sangat aktif dalam melakukan pemecahan gula pada fase *primary fermentation (logarithmic phase)*. Selain itu, pada penelitian ini, pengukuran gula dilakukan menggunakan alat *refractometer*, dimana prinsip kerja dari alat ini membaca nilai gula berdasarkan tingkat kekeruhan sampel yang akan berpengaruh pada hasil *original gravity* yang dihasilkan.

4.2.3. Aktivitas Antioksidan

Antioksidan adalah molekul endogen maupun eksogen yang dapat berperan sebagai pengurang segala bentuk *stress* oksidatif. Aktivitas antioksidan merupakan kapasitas maksimum antioksidan dalam menetralkan adanya radikal bebas. Penetralkan ini dapat berlangsung karena adanya donor atom H^+ (hidrogen) yang dapat mencegah terjadinya kerusakan pada jaringan tubuh oleh adanya radikal bebas yang sudah ada dalam tubuh maupun masuk dalam tubuh baik secara sengaja ataupun tidak sengaja (Adebo & Medina-Meza, 2020). *Phytochemicals* merupakan komponen yang banyak mengandung antioksidan, dimana didalamnya termasuk *tannin*, *phenolic compound*, *phytosterols*, β -*glucan*, dan *carotenoids*. Komponen-komponen tersebut banyak dijumpai pada jenis biji-bijian terutama pada *barley* dan jagung, sebagaimana bahan tersebut yang digunakan dalam penelitian ini.

Dalam proses fermentasi banyak terjadi degradasi komponen protein yang akan berpengaruh pada total *phenolic compound* yang dihasilkan pada bir. *Phenolic compound* yang dihasilkan ini, akan memiliki kaitan yang erat pula dengan mikroorganisme yang aktif dalam mendegradasi selama fermentasi berlangsung. *Saccharomyces uvarum* sebagai mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian ini, merupakan salah satu mikroorganisme yang selama fermentasi banyak menghasilkan komponen yang bersifat menangkal radikal bebas dengan melepaskan komponen *bioactive* seperti peptida dan oligosakarida. Kedua komponen ini banyak ditemukan pada olahan fermentasi jagung melalui uji DPPH (Adebo & Medina-Meza, 2020). Hal ini serupa dengan hasil penelitian yang ada, bahwa formulasi bir B3 dan B4 dengan penambahan *adjuncts grits* jagung mengalami peningkatan aktivitas antioksidan melalui metode pengujian DPPH (Tabel 10.) setelah melalui proses fermentasi.

Peningkatan aktivitas antioksidan juga terjadi pada formulasi bir B1 setelah melalui proses fermentasi.

Berdasarkan Tabel 10., dapat diketahui pula bahwa semakin banyak ditambahkan *grits* jagung dalam proses *brewing* bir akan menurunkan tingkat aktivitas antioksidan dalam bir, hal ini terjadi baik pada sampel *cold wort* hingga *finish product* bir. Hal yang sangat mempengaruhi adalah penggunaan bahan baku *malt barley* selama proses *brewing*. Dalam *malt barley* sendiri banyak mengandung β -*glucan* dibandingkan dengan *grits* jagung, dimana komponen ini merupakan salah satu komponen *bioactive* yang berperan aktif sebagai antioksidan. Selain karena kandungan β -*glucan* yang tinggi, kandungan protein lainnya seperti halnya *tannins* banyak dijumpai pada bahan *barley* (Phieter, *et al.*, 2020) yang dapat dijadikan sebagai sumber antioksidan alami. Sehingga semakin banyak ditambahkan *adjuncts* selain *malt barley* akan menurunkan tingkat aktivitas antioksidan didalam produk bir.

4.2.4. Etil dan Metil Alkohol (*Ethanol* dan *Methanol*)

Selama fermentasi bir berlangsung, tidak hanya diproduksi karbon dioksida (CO₂) dan *by products* namun juga dihasilkan produk utama yakni alkohol. Alkohol yang terbentuk selama proses fermentasi bir tidak hanya *ethanol*, namun juga terbentuk alifatik alkohol lainnya seperti *higher alcohol* dan *methanol*. Pada produk bir, jenis alkohol yang banyak ditemui selain *ethanol* adalah *higher alcohol*. *Higher alcohol* adalah salah satu komponen dalam golongan alkohol yang bila dikonsumsi dalam jumlah besar akan menyebabkan sakit kepala, mabuk bahkan keracunan oleh karena *higher alcohol* tidak mudah untuk dipecah oleh tubuh dibandingkan dengan *ethanol* (Kunze, 2004). Pada proses fermentasi bir harus dikontrol semaksimal mungkin untuk meminimalisir pembentukan *higher alcohol*. Kandungan *higher alcohol* dalam suatu produk bir akan semakin meningkat seiring meningkatnya kandungan alkohol dalam produk bir (Kunze, 2004). Selain karena kandungan *higher alcohol*, dalam produk minuman fermentasi beralkohol juga tidak boleh didapati kandungan *methanol* didalamnya. *Methanol* merupakan bentuk sederhana dari alkohol berbentuk cairan bening yang memiliki tingkat resiko kesehatan lebih tinggi dibandingkan dengan *ethanol* oleh

karena mudahnya terpecah menjadi *formaldehyde* menjadi asam format yang dapat menyebabkan gangguan pencernaan, sesak napas dan sakit kepala.

Berdasarkan jenis birnya, rentang kandungan alkohol pada bir jenis *Pilsener* adalah 3,4%-4,5% *alcohol by weight* atau 4,4%-5,7% *alcohol by volume* (Kunze, 2004). Pada Tabel 11., dapat diketahui bahwa kandungan *ethanol* tertinggi adalah B1 (4,05%), diikuti B3 (3,70%) dan terendah adalah B4 (3,49%). Tingginya kandungan *ethanol* pada formulasi B1 dikarenakan oleh tingginya pula kandungan ekstrak gula dalam *wort* B1 (15°*Brix*) bila dibandingkan dengan B3 dan B4. Kandungan ekstrak gula yang tinggi akan meningkatkan *fermentable sugar* pada *wort* yang dapat dimanfaatkan *yeast* untuk membentuk *ethanol*. Selain karena kandungan *fermentable sugar* pada *wort*, pemenuhan akan *aerasi wort* juga sangat dibutuhkan dalam proses *anaerobic*, yakni proses pembentukan alkohol pada bir. Menurut Jakobsen & Thorne (1980) fermentasi dengan menggunakan *Saccharomyces uvarum*, membutuhkan kadar oksigen pada *wort* jauh lebih banyak 5 ppm dibandingkan dengan menggunakan jenis *Saccharomyces cerevisiae*. Hal ini dikarenakan kemampuan *Saccharomyces uvarum* dalam mengonversi gula menjadi alkohol lebih rendah (3-8%) bila dibandingkan dengan *Saccharomyces cerevisiae* (18-20%).

Kadar *ethanol* produk bir pada penelitian ini sudah sesuai dengan SNI (Tabel 17.) dengan kandungan kurang dari 5%, namun belum memenuhi kriteria pada syarat mutu bir *pilsener* menurut *Brewers Association* (Tabel 16.), selain disebabkan kurang maksimalnya *fermentable sugar* pada *wort*, pengukuran *ethanol* pada penelitian ini menggunakan prinsip distilasi dapat memberikan pengaruh terhadap kadar *ethanol*, mengingat *ethanol* merupakan alkohol yang mudah menguap karena panas. Sehingga pengukuran kandungan alkohol dalam produk bir lebih baik menggunakan metode *chromatography* agar didapatkan hasil yang jauh lebih representatif.

4.3. Analisis Mikrobiologi

Analisis mikrobiologi pada penelitian ini dikategorikan menjadi 2 macam, yakni analisis *Total Plate Count* dan *Yeast Viability*. Kedua analisis ini dapat dijadikan sebagai cara yang dapat diandalkan untuk mengontrol kualitas fermentasi bir serta untuk meningkatkan proses fermentasi yang berlangsung. *Total Plate Count* adalah metode perhitungan banyaknya koloni *yeast* yang dapat tumbuh dalam media agar plat. Metode ini memudahkan dalam perhitungan *pitching rate* pada tahapan awal fermentasi bir. Sedangkan, viabilitas *yeast* adalah metode perhitungan kemampuan kinerja *yeast* selama fermentasi dengan membandingkan jumlah *yeast* yang hidup dan mati, dengan menggunakan metode pewarnaan *methylene blue* (Bottari, et al., 2014).

Berdasarkan Tabel 12., pengujian *total plate count* didapatkan hasil rerata *yeast* $5,51 \pm 4,47 \times 10^7$ CFU/mL, yang menunjukkan bahwa *yeast* yang digunakan sudah memenuhi standar *pitching* dalam fermentasi bir yang membutuhkan minimal $0,7 \times 10^7$ CFU/mL *yeast* (Verbelen, et al., 2009). Kuantitas *yeast* yang digunakan dalam penelitian ini adalah 120 mL ke dalam 1800 mL *cold wort*. Verbelen, et al., (2009) menjelaskan dengan penambahan inokulum sebanyak 120 mL akan meningkatkan pertumbuhan *yeast* (*logarithmic phase*) hanya dalam waktu 90 jam dalam fase *primary fermentation*. Pada fase ini, *yeast* akan menggunakan oksigen (*aerobic phase*) yang terkandung dalam *cold wort* untuk memperbanyak populasi serta memenuhi komponen *glycogen* yang dibutuhkan *yeast* dalam proses *secondary fermentation* (*anaerobic phase*). Pada fase *secondary fermentation*, *yeast* akan berada tahap stasioner yang akan banyak memproduksi *ethanol* dan karbondioksida sebagai produk utama fermentasi bir (Verbelen, et al., 2009) Setelah proses *secondary fermentation* berakhir, selanjutnya akan ada proses maturasi (pematangan bir), dimana kondisi *yeast* sudah banyak yang mati dan akan mengendap pada bagian bawah *fermentor* (*bottom fermentation*) dan akan dilakukan penyaringan untuk memisahkan *yeast* dengan produk bir yang sudah siap diberi CO₂.

Pengukuran dengan pewarnaan *methylene blue* merupakan perhitungan viabilitas *yeast* yang biasa digunakan dalam *brewing beer*. Prinsip dari perhitungan ini dengan membandingkan jumlah sel *yeast* yang hidup maupun mati dengan jumlah total sel *yeast* yang teramati (Bottari, *et al.*, 2014). Sel *yeast* yang mati akan menyerap warna biru dari *methylene blue*, sedangkan sel *yeast* yang hidup akan berwarna transparan. *Methylene blue* adalah salah satu indikator pewarnaan bakteri yang mudah mengalami reaksi reduksi dan oksidasi yang berakibat pada perubahan warna pada dinding sel bakteri yang diberi pewarnaan. Wachid & Mutia (2019), menjelaskan pula bahwa, sel *yeast* yang sudah mati akan memunculkan warna biru akibat dari reaksi oksidasi oleh *methylene blue*. Semakin pekat warna (biru hingga ungu kehitaman) yang dihasilkan maka semakin banyak reaksi oksidasi yang terjadi. Kunze (2004), menjelaskan kematian sel *yeast* selama fermentasi bir diakibatkan karena proses *budding yeast* akan membuat *yeast* menjadi terluka dan meninggalkan *scar*. Semakin banyak *scar* pada dinding *yeast*, semakin tua usia *yeast* dan akan menurunkan kualitas *yeast* dalam fermentasi. Hal ini merupakan faktor utama sel *yeast* mati dan sudah tidak efektif dalam melakukan fermentasi lagi (Kunze, 2004).

Kemampuan *yeast* akan menurun selama proses fermentasi ditunjukkan melalui rendahnya nilai viabilitas. Semakin rendah nilai viabilitas yang didapatkan maka kualitas *yeast* dalam kondisi yang tidak optimal dalam melakukan proses fermentasi. Sedangkan nilai viabilitas yang tinggi maka kualitas *yeast* dalam kondisi optimal untuk melakukan proses fermentasi (Wachid & Mutia, 2019). Berdasarkan Tabel. 13, dapat dilihat bahwa inokulum *yeast* memiliki viabilitas mencapai 97,78% dimana menurut Heineken (2014) standar minimal viabilitas inokulum *yeast* adalah 95%, sehingga inokulum *yeast* yang digunakan pada penelitian ini dalam keadaan yang optimal untuk melakukan proses fermentasi. Seiring berjalannya proses fermentasi, viabilitas *yeast* menurun seperti yang ditunjukkan pada Tabel 14., viabilitas *yeast* pada akhir fermentasi menurun dengan viabilitas sebesar 36%-42%. Persentase tersebut menunjukkan bahwa *yeast* sudah tidak optimal dalam fermentasi, sehingga diperlukan pemanenan/pemisahan dengan bir yang sudah selesai fermentasi. Proses pemisahan ini menjadi salah satu hal yang penting karena *yeast* yang sudah mati akan memiliki pengaruh yang besar terhadap pH bir juga *flavor* produk akhir bir (Kunze, 2004).

Pada penelitian ini hanya dilakukan pengujian *yeast* sebelum dan sesudah fermentasi menggunakan metode pewarnaan, dikarenakan pengujian ini jauh lebih efektif guna mengontrol fermentasi bir (Bottari *et al.*, 2014) terlebih bila menggunakan *haemocytometer* sebab tidak hanya akan mengetahui viabilitas *yeast*, namun banyaknya *yeast* yang tumbuh selama fermentasi.

4.4. Analisis Sensori

Analisis sensori dilakukan untuk mengetahui tingkat keberterimaan panelis terhadap produk bir dengan rasio penambahan *extract malt barley* dan *grits* jagung. Tingkat keberterimaan panelis diinterpretasikan dalam bentuk penilaian terhadap atribut sensori yang mewakili karakteristik bir itu sendiri. Atribut yang dinilai antara lain ialah warna, aroma, rasa, *bitterness* dan *overall*. Panelis yang terlibat aktif dalam penelitian ini merupakan panelis yang tidak terlatih, memiliki pengetahuan tentang minuman beralkohol, serta memiliki kegemaran dalam mengonsumsi bir. Panelis ini merupakan mahasiswa Fakultas Teknologi Pertanian UNIKA Soegijapranata Semarang, dengan jumlah panelis sebanyak 28 orang yang didapatkan melalui seleksi tahap awal menggunakan *goole form* (Lampiran 5.), serta telah menjadi panelis pada penelitian pendahuluan.

Berdasarkan Tabel 15., dapat diketahui perbedaan nyata pada atribut warna, sedangkan atribut aroma, rasa, *bitterness* dan *overall* tidak didapati perbedaan nyata antar formulasi. Formulasi dengan nilai rata-rata atribut warna yang paling tinggi berdasarkan penilaian panelis adalah 15% *grits* jagung manis : 85% *extract malt barley* (B4). Penelitian ini memiliki kesesuaian dengan teori Anonim (2014^a) yang mengungkapkan tentang tujuan penambahan *adjuncts* untuk meningkatkan kualitas warna pada produk akhir bir. Hal ini juga bersesuaian dengan Rouf Shah *et al.*, (2016) mengenai penambahan *grits* jagung sebagai *adjuncts* akan memperbaiki penampakan bir karena adanya pigmen kuning dari komponen karotenoid yang banyak ditemui pada *endosperm* jagung manis. Nilai rata-rata atribut aroma dan *bitterness* yang tertinggi menurut panelis adalah 10% *grits* jagung manis : 80% *extract malt barley* (B3). Aroma khas produk bir dihasilkan melalui isomerasi resin yakni *alpha-acid* yang terjadi

selama proses *boiling wort* (pemekatan *wort*). Resin ini pula akan menjaga kualitas serta meningkatkan *flavour* pada bir (Kunze, 2004). Selain berpengaruh pada aroma yang dihasilkan, *alpha-acid* yang stabil merupakan salah satu minyak esensial, *monoterpenes* dan *sesquiterpene* senyawa volatile pada *hops* yang memberikan rasa pahit guna menyeimbangkan rasa manis yang dihasilkan dari *extract malt barley*. Kandungan *polyphenol* berupa *tannin* dapat menyumbangkan rasa pahit dan getir (*astringent*) pada bir yang dihasilkan, dimana komponen ini banyak ditemui pada bahan baku utama yakni *extract malt barley* (Phieter *et al.*, 2020). Berbeda dengan atribut rasa, nilai rata-rata tertinggi pada atribut rasa menurut panelis adalah 0% *grits* jagung manis : 100% *extract malt barley* (B1). Rasa sangat berkaitan erat dengan *mouthfeel* dan *body* suatu produk minuman. Formulasi B1 memiliki kandungan *apparent extract* yang jauh lebih tinggi bila dibandingkan formulasi B3 dan B4 (Tabel 9.), menurut Kunze (2004). *apparent extract* yang cukup tinggi akan meningkatkan *body beer* sehingga membuat cita rasa bir jauh lebih baik. Atribut keseluruhan/*overall* terbaik menurut panelis adalah formulasi 10% *grits* jagung manis : 80% *extract malt barley*.

Aftertaste yang diterima panelis berupa rasa manis setiap formulasi yang ada. Berdasarkan Tabel 15., formulasi B1 didapati 1 panelis, formulasi B3 didapati 3 panelis dan formulasi B4 didapati 6 panelis. *Aftertaste* manis pada produk bir dapat disebabkan oleh adanya komponen ester didalam produk. Ester adalah salah satu *flavour* yang merupakan hasil reaksi alkohol dan *ester fatty acyl-coA*, dimana komponen ini merupakan senyawa aromatik yang berkontribusi memberikan aroma serta rasa menyerupai bunga dan buah. *Flavour* yang memberikan aroma serta rasa menyerupai bunga dan buah dalam produk bir dapat ditolerir pada konsentrasi yang tepat, jika terlalu tinggi kadarnya akan mempengaruhi kualitas bir yang dihasilkan. Komponen ester yang memiliki peran dalam fungsi organoleptic produk bir antara lain 2-feniletil asetat, etil kaproat, isobutil asetat isoamil asetat dan etil asetat. Keberadaan komponen ester dalam produk bir dapat diminimalisir dengan cara mengontrol proses fermentasi seperti suhu fermentasi (suhu fermentasi lebih dari 13°C memicu tingginya pembentukan ester), *pitching rate* dengan *cold wort* dan *aerasi cold wort* (kurangnya kadar oksigen dalam *cold wort* meningkatkan pembentukan ester) (Kunze, 2004).