

## METODE EKSTRAKSI DAN ISOLASI PROTEIN DARI BIOMASSA HIJAU TUMBUHAN

*Extraction And Isolation Method Of Green Biomass-Based Protein*

**Wildan Suhartini<sup>1,2\*</sup>, Isnaini Rahmadi<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Industri, Institut Teknologi Sumatera, Lampung, Indonesia

<sup>2</sup>Food Science Departement, Faculty of Agricultural, Food Sscience, and Environmental Management, Debrecen University, Debrecen, Hungary

\*e-mail: wildan.suhartini@tp.itera.ac.id

### ABSTRAK

Konsumsi protein secara global terus meningkat. Sebagian besar kebutuhan protein dipenuhi dengan mengonsumsi daging hewan ternak, ikan, serangga, sayuran, sel tunggal, dan biomassa tumbuhan hijau. Biomassa hijau tumbuhan memiliki potensi untuk menjadi sumber protein baik secara kuantitas maupun kualitas. Hasil protein yang dihasilkan dari biomassa tumbuhan hijau bergantung pada teknologi yang digunakan, proses isolasi yang dipilih, dan tanaman spesifik dari mana biomassa tersebut berasal. Artikel ini menyajikan ulasan tentang berbagai proses fraksinasi untuk mengisolasi protein dari biomassa tumbuhan hijau berdasarkan temuan penelitian dan literatur terkait. Biomassa tumbuhan hijau diubah menjadi konsentrat protein melalui ekstraksi dan isolasi. Tahap seleksi meliputi pemilihan spesies tanaman, pemanenan, dan pengepresan. Beberapa teknik dapat dilakukan pada tahap isolasi protein, termasuk koagulasi termal, microwave, fermentasi, ultrafiltrasi, isolasi CO<sub>2</sub> superkritis, pengendapan pH, gabungan asam termal, sentrifugasi, dan flokulan. Metode isolasi yang digunakan memengaruhi kuantitas dan kualitas konsentrat protein yang dihasilkan. Oleh karena itu, proses isolasi protein harus mempertimbangkan dampak suhu, pH, dan keberadaan zat lain, seperti gula, terhadap hasilnya.

**Kata kunci:** Biomassa hijau, Biorefinery, sari hijau, konsentrat protein tumbuhan,

### ABSTRACT

*The global consumption of protein continues to rise. Most protein requirements are met by consuming livestock, fish, insects, vegetables, single cells, and green plant biomass. Green plant biomass has the potential to be a source of protein in both quantity and quality. The yield of protein produced from green plant biomass is contingent upon the technology employed, the isolation process utilized, and the specific plant from which the biomass is derived. This article presents an overview of various fractionation processes for isolating green plant biomass proteins based on research findings and related literature. Green plant biomass is converted into a protein concentrate through extraction and isolation. The selection stage encompasses selecting plant species, harvesting, and pressing. Several techniques can carry out The protein isolation stage, including thermal coagulation, microwave, fermentation, ultrafiltration, supercritical CO<sub>2</sub> isolation, pH precipitation, combined acid thermal, centrifugation, and flocculant. The isolation method employed affects the quantity and quality of the protein concentrate produced. Consequently, the protein isolation process must consider the impact of temperature, pH, and the presence of other substances, such as sugar, on the outcome.*

**Keyword:** Biorefinery, green biomass, green juice, leaf protein concentrate

## PENDAHULUAN

*Food and Agriculture Organization* (FAO) memproyeksikan konsumsi protein terus meningkat setiap tahunnya secara global. Proyeksi total konsumsi protein di dunia pada tahun 2022-2031 sebanyak 409.437 ton atau mengalami kenaikan 1,15%. Kenaikan konsumsi protein berdasarkan kawasan yaitu Amerika utara 0,81%, Amerika latin 1,36%, Eropa 0,07%, Afrika 1,98%, Oseania 1,54%, dan Asia 1,5%. Secara spesifik, proyeksi konsumsi protein di Indonesia tumbuh 2,19% (*OECD-FAO Agricultural Outlook*, 2022). Semakin tinggi persentase konsumsi protein yang proyeksikan, menandakan bahwa konsumsi protein saat ini di kawasan atau negara tersebut dikategorikan rendah.

Pemenuhan kebutuhan protein umumnya didapatkan dari berbagai sumber, seperti hewan ternak (ruminansia dan unggas), ikan, serangga (Hasnol et al., 2020), sayuran, sel tunggal (Azmi et al., 2021) dan biomassa hijau tumbuhan (Domokos-Szabolcsy et al., 2022, 2023; Kaszás et al., 2022; Nynäs et al., 2024). Daging menjadi sumber utama dalam pemenuhan kebutuhan protein. Namun, sistem produksi ternak tidak stabil, kebutuhan lahan yang luas, serta kebutuhan energi dan pakan yang sangat tinggi. Oleh karena itu, dibutuhkan alternatif sumber protein lain yang berkualitas, baik untuk pangan maupun pakan. Biomassa hijau tumbuhan, baik secara kuantitas dan kualitasnya, dapat dijadikan sumber potensial protein (Domokos-Szabolcsy et al., 2023;

Gaffey et al., 2023; Pearce & Brunke, 2023). Biomassa hijau tumbuhan merupakan tumbuhan hijau muda yang dipanen sebelum berbunga dengan tujuan untuk diambil protein yang terkandung di dalamnya.

Protein yang berasal dari biomassa hijau mengandung sekitar 50% protein *Rubiribulose-1,5-bisphospate-carboxylase / oxygenase* (RuBisCo) yang mengkatalis fiksasi karbon dalam proses fotosintetis (Erb & Zarzycki, 2018; Feller et al., 2008). Protein yang kaya RuBisCo memiliki nilai gizi yang tinggi dan sifat fungsional yang baik, sehingga menarik untuk dijadikan sebagai bahan pangan (Nieuwland et al., 2021; Nynäs et al., 2024). Sejauh ini protein yang berasal dari biomassa hijau tumbuhan belum ada laporan mengenai dampak negatif baik bagi manusia maupun hewan ternak. Selain itu, konsep biomassa hijau tumbuhan sebagai sumber protein memberikan dampak positif terhadap lingkungan, seperti kuantitas pakan berkurang sebanyak 17% ketika dicampurkan dengan protein tersebut (Zira et al., 2023), masa panen yang cepat, penanganan yang mudah, serta kuantitas yang melimpah.

Tanaman legume dan sereal telah banyak diteliti di beberapa negara seperti Belanda, Hungaria, Amerika, dan Swedia secara keseluruhan memberikan hasil yang signifikan (Domokos-Szabolcsy et al., 2023). Rendemen dan kualitas protein yang dihasilkan bergantung pada teknologi dan proses isolasi yang dilakukan, serta jenis tanaman biomassa

tumbuhan hijau (Damborg et al., 2020; Nynäs et al., 2021; Prade et al., 2021; Stødkilde et al., 2021). Sampai saat ini, inovasi isolasi protein dari biomassa hijau tumbuhan terus dikembangkan baik teknologi, proses, maupun jenis tanamannya. Oleh karena itu, artikel ini membahas berbagai proses fraksinasi hingga isolasi protein biomassa hijau tumbuhan. Artikel disusun berdasarkan hasil penelitian dan referensi terkait.

### PROSES KONVERSI BIOMASSA HIJAU MENJADI KONSENTRAT PROTEIN

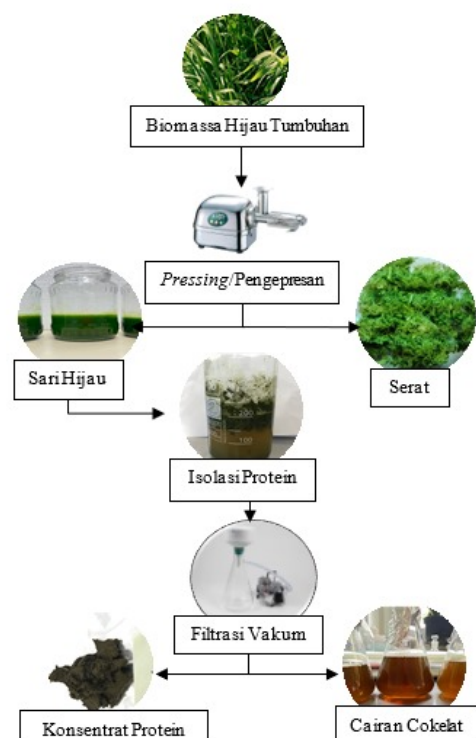
Konversi biomassa hijau tumbuhan menjadi konsentrat protein secara umum dilakukan dalam beberapa tahap, yaitu pemilihan spesies tanaman, pemanenan, dan pengepresan (Møller et al., 2021). Isolasi protein dapat dilakukan dengan berbagai metode, diantaranya koagulasi termal, microwave, fermentasi, ultrafiltrasi, isolasi CO<sub>2</sub> superkritis, presipitasi pH, termal kombinasi asam, sentrifugasi, dan flokulan. Proses konversi biomassa menjadi konsentrat protein dapat dilihat pada **Gambar 1**. Artikel ini membagi tahapan dalam menghasilkan konsentrat protein menjadi dua, yaitu proses ekstraksi dan proses isolasi biomassa hijau tumbuhan

### PROSES EKSTRAKSI PROTEIN BIOMASSA HIJAU TUMBUHAN

Secara rinci, berikut tahapan ekstraksi protein dari biomassa hijau tumbuhan.

### Pemilihan Spesies Tanaman

Diperlukan pertimbangan beberapa aspek dalam pemilihan spesies tanaman yang dijadikan sumber biomassa hijau. Pertimbangan tersebut diantaranya dukungan terhadap ekosistem dari tanaman, seperti potensi hama, penggunaan pupuk nitrogen seminimal mungkin, dampak terhadap kesuburan tanah, dan manajemen pengendalian penyakit yang sederhana dan mudah (Wiggering et al., 2012). Rendemen dan kualitas protein yang dihasilkan juga menjadi pertimbangan penting (Wilkins & Jones, 2000), umur panen, kemudahan dalam penanganan dan proses isolasi protein, serta bebas dari GMO dalam mengikuti standar Eropa.



**Gambar 1.** Proses Isolasi Protein

Beberapa tanaman yang telah dipilih diantaranya alfalfa, vetch, tritikale, daun singkong, dan jerusalem artichoke. Selain itu, limbah hasil pertanian yang telah dicoba diantaranya daun dari tanaman brokoli, bunga kol, mentimun, kentang, wortel, dan tomat yang memiliki kadar protein antara 22,5% (wortel) sampai 50% (daun kentang). Dilihat dari kandungan asam aminonya, konsentrat protein dari limbah pertanian relatif sama. Meskipun demikian, potensi keberlimpahan bahan baku berbeda-beda, misalnya limbah daun tomat, kentang, dan mentimun mencapai 1500 kg/ha, sedangkan wortel 112 kg/ha.

#### **Pemanenan**

Spesies tanaman yang dipilih, selanjutnya ditanam, dan dipanen. Pemanenan dilakukan pada saat tanaman berada pada fase puncak tumbuh lebat. Produk utama yang diambil adalah daun dan batang muda, sehingga pemanenan dilakukan sebelum tanaman tersebut berbunga, daun banyak yang tua, dan batang yang telah keras. Batang yang terlalu keras akan menyulitkan pada tahap proses *pressing* atau pemisahan sari hijau dengan serat secara mekanik (Bals et al., 2012). Bagian akar, batang yang keras, dan daun yang telah menguning disarankan untuk dipisahkan dan tidak ikut diolah menjadi konsentrat protein. Sebelum memasuki proses selanjutnya, bagian tanaman yang dipilih dicuci terlebih dahulu agar tidak terdapat kontaminan atau kotoran yang terbawa.

#### **Pengepresan/Ekstraksi**

Proses pengepresan atau pemisahan sari hijau dengan serat dilakukan dengan dua tahap berdasarkan metode Bals et al., (2012). Pertama, dilakukan perusakan dinding sel untuk melepaskan bahan intraseluler menggunakan penggiling dan penggulung. Kedua, bubur hasil penggilingan dan penggulungan ditekan sehingga sari hijau dan serat terpisah. Metode dua tahap ini tidak efisien dilakukan untuk skala menengah dan industri, sehingga dikembangkan metode yang efektif dan efisien secara ekonomi dengan menggunakan mesin ekstraksi sari dua sekrup ulir baling-baling terpisah.

Penelitian Arlabosse et al., (2011) dan Colas et al., (2013), pengepresan menggunakan mesin ekstraksi sari dua sekrup ulir baling-baling meningkatkan rendemen sari hijau dan efisiensi 60-65%. Hal ini dikarenakan terjadinya maserasi dinding tanaman pada saat pengepresan. Umumnya, pengepresan ekstraksi sari hijau dilakukan hanya sekali, tetapi beberapa peneliti membuktikan bahwa pengepresan berulang dengan menambahkan air sebanyak 5-6% dapat meningkatkan kandungan protein sebesar 13-17% (H. Edwards et al., 1978; Knuckles et al., 1972).

Selain mesin ekstraksi dan jaringan tanaman, pH dan suhu juga menjadi faktor penting yang berpengaruh terhadap rendemen sari hijau dan kadar protein. Menambahkan alkali pada tanaman yang telah dipotong-potong kecil hingga mencapai pH 7,0-8,0 dapat

meningkatkan efisiensi dan efektifitas proses ekstraksi. Hal ini karena dinding sel tanaman menjadi lebih mudah hancur (Sari, Mulder, et al., 2015; Sari, Syafitri, et al., 2015),. Namun, pH tersebut tidak lebih dari 8,0 untuk menghindari denaturasi protein. Selain itu, suhu jaringan tanaman yang terlalu panas atau terlalu dingin menghasilkan ekstrak sari hijau yang sedikit. Suhu optimum tanaman sebelum dan pada saat ekstraksi berkisar antara 3 °C sampai 35 °C (Hanna & Ogden, 2002).

#### **Filtrasi Vakum**

Sari hijau yang telah melalui proses isolasi protein, selanjutnya dilakukan penyaringan dengan filtrasi vakum menggunakan pompa vakum dan kain saring atau membran filter dengan ukuran pori 5 µm.

#### **METODE ISOLASI PROTEIN BIOMASSA HIJAU TUMBUHAN**

Rendemen dan kualitas konsentrat protein dari biomassa hijau tumbuhan dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya metode isolasi protein. Perbandingan metode isolasi protein terhadap rendemen yang dihasilkan disajikan pada **Tabel 1**.

#### **Koagulasi Protein dengan Termal**

Isolasi protein dari biomassa tumbuhan hijau terutama dengan koagulasi termal dilakukan pada suhu 60-95 °C (Santamaría-Fernández & Lübeck, 2020). Namun, mengingat protein dari tumbuhan dan daun terdiri dari enzim RuBisCo sebanyak 50% (Martin et al., 2014) dimana suhu denaturasinya pada 76,2°C (Lamsal et al.,

2007), sehingga suhu optimum koagulasi termal yaitu 80 °C (Pirie, 1971). Protein sensitif terhadap panas yang dapat mengganggu struktur protein dan menurunkan kelarutan dalam air dengan membuka jalur hidrofobik (Bals et al., 2012). Proses koagulasi termal dapat dilakukan dengan dua tahap, yaitu sari hijau dipanaskan hingga suhu 55 °C sehingga didapatkan fraksi protein hijau. Selanjutnya supernatan dipanaskan sampai suhu 80 °C dan didapatkan fraksi protein putih.

Metode koagulasi termal praktis dan mudah dilakukan. Namun, sari hijau yang dipanaskan sampai suhu 80 °C selama 2-4 menit secara langsung memiliki kualitas konsentrat protein yang berbau rumput dan kelarutan dalam air yang rendah. Selain itu, konsentrat protein yang dihasilkan tidak mudah dicerna, rasa yang tidak enak, dan gugus fungsi protein yang dapat berubah (Lamsal et al., 2007).

#### **Koagulasi Protein dengan Microwave**

Metode isolasi protein dengan koagulasi microwave dilakukan dengan cara memasukkan sari hijau ke dalam microwave dan dipanaskan sampai mencapai suhu 80-85 °C pada panjang gelombang 2.500 Ghz (fári & Domokos-szabolcsy, 2019). Metode ini efektif dalam menghemat energi dibandingkan dengan metode koagulasi termal konvensional.

Selain menggunakan microwave secara tunggal, juga dapat dikombinasikan dengan metode konvensional. Hal ini dilakukan dengan memanaskan sari hijau sampai suhu

40-60 °C, dilanjutkan dengan microwave sampai menjacapai suhu sekitar 80 °C. Metode koagulasi microwave menjadikan sistem koloid yang koheren dan struktur molekul terdispersi.

Selain itu, pemisahan konsentrat protein dengan cairan cokelat lebih mudah dikarenakan sifat fisik konsentrat protein yang lebih keras.

**Tabel 1.** Perbandingan Metode Isolasi Protein Biomassa Hijau Tumbuhan

| Metode Isolasi                             | Jenis Tumbuhan                                        | Kandungan Protein (%) | Referensi                           |
|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------|-------------------------------------|
| Koagulasi Termal                           | Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> )                    | 46                    | (Corona et al., 2018)               |
|                                            | Semanggi campur rerumputan                            | 47                    |                                     |
|                                            | Gandum hitam (Ryegrass)                               | 50,7                  |                                     |
|                                            | Gandum hitam (Ryegrass)                               | 33,9                  | (Ravindran et al., 2021)            |
|                                            | Batang dan Pucuk Kentang                              | 45,3                  | (Hanczakowski et al., 1981)         |
|                                            | Bit gula/Sugar bit                                    | 31,3-41,4             | (Tamayo Tenorio et al., 2016)       |
|                                            | Bit gula (konsentrat protein putih)                   | 43,6-47,7             | (Jwanny et al., 1993)               |
|                                            | Brokoli (konsentrat protein putih)                    | 27,2-37,6             | (Prade et al., 2021)                |
|                                            | Kubis kale                                            | 16.7-30.4             |                                     |
|                                            | Daun Singkong                                         | 42,2                  | (Gundersen et al., 2022)            |
| Koagulasi termal 2 tahap pemanasan         | Gandum hitam (Ryegrass)                               | 22,8-24,6             | (Damborg et al., 2020)              |
|                                            | Semanggi merah                                        | 34,6-35,6             |                                     |
|                                            | Semanggi Putih                                        | 40,4-45,1             |                                     |
|                                            | Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> )                    | 32,3-40,5             |                                     |
| Koagulasi Microwave                        | Kubis mini/Brussels sprouts                           | 37,4                  | (Domokos-Szabolcsy et al., 2023)    |
|                                            | Bunga kol ( <i>Brassica oleracea</i> , var. botrytis) | 44,1                  |                                     |
|                                            | Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> )                    | 40,3                  |                                     |
|                                            | Tritikale                                             | 41                    |                                     |
|                                            | Pohon kedelai muda                                    | 41,9                  |                                     |
|                                            | Lobak Pedas (Horseradish)                             | 25,3                  |                                     |
|                                            | Paprika hijau                                         | 31,2                  |                                     |
|                                            | Jerusalem artichoke                                   | 33,4                  | (Kaszás et al., 2022)               |
|                                            | Brokoli ( <i>Brassica oleracea</i> , Italica)         | 35,3                  | (Domokos-Szabolcsy et al., 2022)    |
|                                            | Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> )                    | 41,0                  | (Santamaría-Fernández et al., 2017) |
| Fermentasi <i>Lactobacillus salivarius</i> | Semanggi merah                                        | 40                    |                                     |
|                                            | Semanggi merah campur rumput                          | 40                    |                                     |
|                                            | Paprika hijau                                         | 26,2                  | (Domokos-Szabolcsy et al., 2023)    |
| Fermentasi Asam laktat                     | Lobak pedas (Horseradish)                             | 24,7                  |                                     |
|                                            | Pohon kedelai muda                                    | 37,1                  |                                     |
|                                            | Triticale                                             | 34,1                  |                                     |
|                                            | Brokoli                                               | 39,2                  |                                     |
|                                            | Bunga kol                                             | 43,1                  |                                     |
|                                            | Kubis mini/Brussels sprouts                           | 34,4                  |                                     |
|                                            | Daun Singkong                                         | 40,4                  | (Gundersen et al., 2022)            |
|                                            | Daun Singkong                                         | 45,1                  |                                     |
| Koagulasi Asam                             | Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> )                    | 37,8-47,4             | (Hansen et al., 2022)               |

### Koagulasi Protein dengan Fermentasi

Isolasi protein dengan metode non-termal atau metode dingin salah satunya yaitu dengan fermentasi. Metode fermentasi ini sangat dipengaruhi oleh pH. pH yang rendah (asam) sangat dibutuhkan untuk dapat mengendapkan protein. Upaya mencapai pH rendah tidak dilakukan dengan menambahkan asam ke dalam sari hijau, tetapi dengan cara inokulasi menggunakan bakteri asam laktat (BAL) seperti *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, dan *Pediococcus* pada suhu 36 °C selama 48 jam.

Inokulasi ini akan menjadikan sari hijau mencapai pH sekitar 3,6-4,0. Selama proses fermentasi, secara alami BAL memproduksi asam organik. Hal ini menyebabkan sari hijau menjadi asam dan membentuk dua fase, yaitu fase cair berupa cairan cokelat dan fase padat berupa konsentrat protein yang mengendap (Ravindran et al., 2021; Santamaria-Fernández & Lübeck, 2020). Jika dibandingkan dengan menurunkan pH menggunakan asam sulfat, secara statistik tidak berpengaruh terhadap kandungan protein yang didapatkan (Santamaria-Fernandez, 2018).

Umumnya fermentasi sari hijau yang dilakukan dengan asam laktat sebanyak 0,5% (b/v). Sari hijau kemudian difermentasi selama 48 jam dengan suhu 35-36 °C dalam kondisi kedap udara. Namun, setiap

biomassa hijau tumbuhan memiliki waktu fermentasi yang berbeda-beda dalam mencapai pH 3,6-4,0, bergantung kandungan gula yang dimilikinya. Oleh karena itu, penting untuk mengetahui nilai *brix* sari hijau tersebut untuk memperkirakan waktu fermentasi, mengingat selama proses fermentasi sari hijau tidak boleh dibuka tutup untuk mencegah kontaminasi. Apabila diketahui nilai *brix* sari hijau rendah dan proses fermentasi memerlukan waktu lebih dari tiga hari, maka sari hijau dapat ditambahkan dengan sukrosa sebanyak 12 g/L.

Metode fermentasi meminimalisasi kerusakan protein, tetapi memerlukan waktu yang lebih lama dan pengatur suhu lingkungan yang baik. Perbandingan hasil koagulasi microwave dan fermentasi asam laktat disajikan pada **Gambar 2**.



Koagulasi Microwave      Fermentasi Asam Laktat  
**Gambar 2.** Perbandingan Metode Isolasi Protein

### Koagulasi Protein dengan Ultrafiltrasi

Isolasi protein dengan ultrafiltrasi dilakukan sebagai alternatif untuk menghindari penggunaan suhu tinggi. Selain suhu yang rendah, waktu isolasi juga harus dilakukan dengan singkat untuk menghindari

hidrolisis protein. Penelitian Hernandez et al., (1995) dilakukan dengan sari hijau dibekukan pada suhu  $-25^{\circ}\text{C}$ , kemudian dipisahkan dengan membran 10 kDa. Dilihat dari kandungan protein yang dihasilkan, metode isolasi ultrafiltrasi yang lebih rendah dibandingkan termal. Isolasi ultrafiltrasi menghasilkan protein 26,3-38,8%, sedangkan metode termal menghasilkan kandungan protein sebesar 46,3% (Kromus et al., 2004).

#### **Koagulasi Protein dengan $\text{CO}_2$ Superkritis**

Isolasi dengan menggunakan  $\text{CO}_2$  superkritis aman untuk pangan, karena tidak beracun dan relatif tidak reaktif. Metode ini umumnya digunakan untuk mendapatkan konsentrat protein yang tidak berbau rumput. Aplikasinya yaitu dengan mengikuti metode (Hansen et al., 2023), yaitu sari hijau dikeringkan terlebih dahulu, kemudian diekstraksi selama 75 menit pada 180, 220, atau 260 bar dengan atau tanpa pelarut sebanyak 1-2 mL/menit. Kondisi yang digunakan pada suhu  $45^{\circ}\text{C}$ , aliran  $\text{CO}_2$  10 mL/menit, waktu dinamis 60 menit, waktu statis 15 menit, aliran *make up* 0,5 mL/menit, dan etanol 96%. Suhu  $45^{\circ}\text{C}$  digunakan untuk meminimalkan hilangnya kelarutan protein. Klorofil dalam ekstrak diperkirakan dengan spektrofotometri menggunakan persamaan berikut (Mouahid et al., 2020):

$$\text{Klorofil}_a = 12.74 \cdot A_{663} - 2.69 \cdot A_{645}$$

$$\text{Klorofil}_b = 12.74 \cdot A_{663} - 2.69 \cdot A_{645}$$

$$\text{Klorofil}_{\text{total}} (\mu\text{g/mL}) = \text{Klorofil}_a + \text{Klorofil}_b$$

#### **Koagulasi Protein dengan *Presipitasi pH***

Menambahkan larutan asam dan basa merupakan salah satu cara yang dapat diterapkan dalam mengisolasi protein dari tanaman. Target pH asam yaitu di bawah 4,5 yang umumnya dengan menambahkan HCl. Selain itu, NaOH ditambahkan untuk mencapai pH 8,0 sehingga dapat melepaskan beberapa asam amino hidrofobik dan menurunkan kelarutan protein. Setelah mencapai pH target, kemudian protein diendapkan dan dilakukan sentrifugasi. Diketahui metode *presipitasi pH* dapat mengendapkan sekitar 95% protein sari hijau dari daun kedelai pada pH 3,7 (Betschart & Kinsella, 1973). Metode ini dapat meningkatkan stabilitas karoten dan lutein, tetapi mempercepat proses oksidasi asam lemak tak jenuh dan struktur konsentrat protein yang longgar (Zhang et al., 2017).

#### **Koagulasi Protein dengan Termal kombinasi Asam**

Metode gabungan perubahan pH sari hijau dengan koagulasi termal dinilai lebih efektif dibandingkan dengan metode pengendapan asam secara tradisional. Metode ini dilakukan dengan cara menurunkan pH hingga mencapai 4,5 kemudian diikuti dengan koagulasi termal. Konsentrat protein yang dihasilkan memiliki rendemen dan pencernaan serta penyerapan yang lebih tinggi (Zhang et al., 2017).

### Koagulasi Protein dengan Sentrifugasi

Isolasi protein dengan metode sentrifugasi terdawali dengan metode koagulasi termal kombinasi asam. Sari hijau dari biomassa hijau tumbuhan diturunkan pH-nya hingga mencapai sekitar 5,0-5,2. Kemudian sari hijau dipanaskan pada suhu 45-50 °C selama satu menit. Dalam beberapa percobaan juga membuktikan bahwa pemanasan dapat dilakukan selama 1-15 menit. Sari hijau yang telah diberikan perlakuan pH dan panas kemudian dapat disentrifugasi. Secara umum, gaya dan waktu efektif yang digunakan dalam isolasi protein dari sari hijau yaitu pada 3000 rpm selama dua menit, atau pada 6000 rpm selama tiga menit (Garger et al., 2005).

Metode sentrifugasi yang kedua yaitu dengan dilakukan sentrifugasi pada 5000 rpm selama 10 menit, kemudian dilakukan koagulasi microwave sampai mencapai suhu 80 °C.

### Koagulasi Protein dengan Flokulan

Isolasi protein dengan bantuan flokulan atau zat yang membantu partikel kecil terkumpul sehingga lebih mudah untuk dikeluarkan dari fase cair. Flokulan yang dapat digunakan dalam isolasi protein dari biomassa hijau tumbuhan baik ionik maupun non-ionik (Knuckles et al., 1980), seperti lignosulfat (la Cour et al., 2019). Penambahan lignosulfat sebanyak 0,6-0,7 g per g protein dapat meningkatkan konsentrasi protein gandum hitam (6%), semanggi merah (5%),

dan bayam (20%) dibandingkan dengan koagulasi termal dan presipitasi asam.

### KESIMPULAN

Rendemen dan kualitas protein yang dihasilkan dari biomassa hijau tumbuhan bergantung pada teknologi, proses isolasi, serta jenis tanaman. Konversi biomassa hijau tumbuhan menjadi konsentrat protein dilakukan melalui tahap ekstraksi dan isolasi. Tahap ekstraksi dimulai dari pemilihan spesies tanaman, pemanenan, dan pengepresan. Isolasi protein dapat dilakukan dengan berbagai metode, seperti koagulasi termal, microwave, fermentasi, ultrafiltrasi, isolasi CO<sub>2</sub> superkritis, presipitasi pH, termal kombinasi asam, sentrifugasi, dan flokulan.

### DAFTAR PUSTAKA

- Arlabosse, P., Blanc, M., Kerfaï, S., & Fernandez, A. (2011). Production of green juice with an intensive thermo-mechanical fractionation process. Part I: Effects of processing conditions on the dewatering kinetics. *Chemical Engineering Journal*, 168(2), 586–592. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.01.027>
- Azmi, A. A. bin, Chew, K. W., Chia, W. Y., Mubashir, M., Sankaran, R., Lam, M. K., Lim, J. W., Ho, Y.-C., & Show, P. L. (2021). Green bioprocessing of protein from *Chlorella vulgaris* microalgae towards circular bioeconomy. *Bioresource Technology*, 333, 125197. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125197>
- Bals, B. D., Dale, B. E., & Balan, V. (2012). Recovery of Leaf Protein for Animal Feed and High-Value Uses. In *Biorefinery Co-Products* (pp. 179–

- 197). John Wiley & Sons, Ltd.  
<https://doi.org/10.1002/9780470976692.ch9>
- Betschart, A., & Kinsella, J. E. (1973). Extractability and solubility of leaf protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 21(1), 60–65.  
<https://doi.org/10.1021/jf60185a019>
- Colas, D., Doumeng, C., Pontalier, P. Y., & Rigal, L. (2013). Green crop fractionation by twin-screw extrusion: Influence of the screw profile on alfalfa (*Medicago sativa*) dehydration and protein extraction. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 72, 1–9.  
<https://doi.org/10.1016/j.cep.2013.05.017>
- Corona, A., Parajuli, R., Ambye-Jensen, M., Hauschild, M. Z., & Birkved, M. (2018). Environmental screening of potential biomass for green biorefinery conversion. *Journal of Cleaner Production*, 189, 344–357.  
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.03.316>
- Damborg, V. K., Jensen, S. K., Weisbjerg, M. R., Adamsen, A. P., & Stødtkilde, L. (2020). Screw-pressed fractions from green forages as animal feed: Chemical composition and mass balances. *Animal Feed Science and Technology*, 261, 114401.  
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114401>
- Domokos-Szabolcsy, É., Elhawat, N., Domingos, G. J., Kovács, Z., Koroknai, J., Bodó, E., Fári, M. G., Alshaal, T., & Bákonyi, N. (2022). Comparison of Wet Fractionation Methods for Processing Broccoli Agricultural Wastes and Evaluation of the Nutri-Chemical Values of Obtained Products. *Foods*, 11(16), Article 16.  
<https://doi.org/10.3390/foods11162418>
- Domokos-Szabolcsy, É., Yavuz, S. R., Picoli, E., Fári, M. G., Kovács, Z., Tóth, C., Kaszás, L., Alshaal, T., & Elhawat, N. (2023). Green Biomass-Based Protein for Sustainable Feed and Food Supply: An Overview of Current and Future Prospective. *Life*, 13(2), 307.  
<https://doi.org/10.3390/life13020307>
- Erb, T. J., & Zarzycki, J. (2018). A short history of RubisCO: The rise and fall (?) of Nature's predominant CO<sub>2</sub> fixing enzyme. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 100–107.  
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.017>
- Fári, M. G., & Domokos-szabolcsy, É. (2019). *Method for producing plant protein coagulum* (World Intellectual Property Organization Patent WO2019150144A1).  
<https://patents.google.com/patent/WO2019150144A1/en?q=Method+for+Producing+Plant+Protein+Coagulum.+Hungarian+Patent+WO%2f2019%2f150144>
- Feller, U., Anders, I., & Mae, T. (2008). Rubiscolytics: Fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated. *Journal of Experimental Botany*, 59(7), 1615–1624.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/ern242>
- Gaffey, J., Rajauria, G., McMahon, H., Ravindran, R., Dominguez, C., Ambye-Jensen, M., Souza, M. F., Meers, E., Aragonés, M. M., Skunca, D., & Sanders, J. P. M. (2023). Green Biorefinery systems for the production of climate-smart sustainable products from grasses, legumes and green crop residues. *Biotechnology Advances*, 66, 108168.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108168>
- Garger, S. J., Holtz, R. B., McCulloch, M. J., & Turpen, T. H. (2005). *A method for isolating and purifying soluble proteins*

- and peptides from plant sources (European Union Patent EP1062235B1).  
<https://patents.google.com/patent/EP1062235B1/en>
- Gundersen, E., Christiansen, A. H. C., Jørgensen, K., & Lübeck, M. (2022). Production of leaf protein concentrates from cassava: Protein distribution and anti-nutritional factors in biorefining fractions. *Journal of Cleaner Production*, 379, 134730. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.134730>
- H. Edwards, R., de Fremery, D., E. Mackey, B., & O. Kohler, G. (1978). Factors Affecting Juice Extraction and Yield of Leaf Protein Concentrate from Ground Alfalfa. *Transactions of the ASAE*, 21(1), 55–0059. <https://doi.org/10.13031/2013.35249>
- Hanczakowski, P., Skraba, B., & Młodkowski, M. (1981). Nutritive value of leaf-protein concentrate from potato haulm for rats and chicks. *Animal Feed Science and Technology*, 6(4), 413–419. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(81\)90019-5](https://doi.org/10.1016/0377-8401(81)90019-5)
- Hanna, M. A., & Ogden, R. L. (2002, May 1). *Expression of alfalfa juice* (world). ACS Publications; American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/jf60232a070>
- Hansen, M., Andersen, C. A., Jensen, P. R., & Hobley, T. J. (2022). Scale-Up of Alfalfa (*Medicago sativa*) Protein Recovery Using Screw Presses. *Foods*, 11(20), Article 20. <https://doi.org/10.3390/foods11203229>
- Hansen, M., Hobley, T. J., & Jensen, P. R. (2023). Treatment with Supercritical CO<sub>2</sub> Reduces Off-Flavour of White Alfalfa Protein Concentrate. *Foods*, 12(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/foods12040845>
- Hasnol, S., Kiatkittipong, K., Kiatkittipong, W., Wong, C. Y., Khe, C. S., Lam, M. K., Show, P. L., Oh, W. D., Chew, T. L., & Lim, J. W. (2020). A Review on Insights for Green Production of Unconventional Protein and Energy Sources Derived from the Larval Biomass of Black Soldier Fly. *Processes*, 8(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/pr8050523>
- Hernandez, T., Centeno, C., Martinez, C., & Hernandez, A. (1995). Effect of Solvent Extraction on the Nitrogen Compounds in Alfalfa Protein Concentrates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(12), 3065–3069. <https://doi.org/10.1021/jf00060a014>
- Jwanny, E. W., Montanari, L., & Fantozzi, P. (1993). Protein production for human use from sugarbeet: Byproducts. *Bioresource Technology*, 43(1), 67–70. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(93\)90085-P](https://doi.org/10.1016/0960-8524(93)90085-P)
- Kaszás, L., Alshaal, T., Kovács, Z., Koroknai, J., Elhawat, N., Nagy, É., El-Ramady, H., Fári, M., & Domokos-Szabolcsy, É. (2022). Refining high-quality leaf protein and valuable co-products from green biomass of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) for sustainable protein supply. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 12(6), 2149–2164. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00696-z>
- Knuckles, B. E., Bickoff, E. M., & Kohler, G. O. (1972). PRO-XAN process. Methods for increasing protein recovery from alfalfa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 20(5), 1055–1057. <https://doi.org/10.1021/jf60183a020>

- Knuckles, B. E., Edwards, R. H., Kohler, G. O., & Whitney, L. F. (1980). Flocculants in the separation of green and soluble white protein fractions from alfalfa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28(1), 32–36. <https://doi.org/10.1021/jf60227a032>
- Kromus, S., Wachter, B., Koschuh, W., Mandl, M., Krotscheck, C., & Narodoslawsky, M. (2004). The Green Biorefinery Austria—Development of an Integrated System for Green Mass Utilization. *Nature*, 18.
- la Cour, R., Schjoerring, J. K., & Jørgensen, H. (2019). Enhancing Protein Recovery in Green Biorefineries by Lignosulfonate-Assisted Precipitation. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fsufs.2019.00112>
- Lamsal, B. P., Koegel, R. G., & Gunasekaran, S. (2007). Some physicochemical and functional properties of alfalfa soluble leaf proteins. *LWT - Food Science and Technology*, 40(9), 1520–1526. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.11.010>
- Martin, A. H., Nieuwland, M., & de Jong, G. A. H. (2014). Characterization of Heat-Set Gels from RuBisCO in Comparison to Those from Other Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(44), 10783–10791. <https://doi.org/10.1021/jf502905g>
- Møller, A. H., Hammershøj, M., dos Passos, N. H. M., Tanambell, H., Stødkilde, L., Ambye-Jensen, M., Danielsen, M., Jensen, S. K., & Dalsgaard, T. K. (2021). Biorefinery of Green Biomass—How to Extract and Evaluate High Quality Leaf Protein for Food? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(48), 14341–14357. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c04289>
- Mouahid, A., Seengeon, K., Martino, M., Crampon, C., Kramer, A., & Badens, E. (2020). Selective extraction of neutral lipids and pigments from *Nannochloropsis salina* and *Nannochloropsis maritima* using supercritical CO<sub>2</sub> extraction: Effects of process parameters and pre-treatment. *The Journal of Supercritical Fluids*, 165, 104934. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104934>
- Nieuwland, M., Geerdink, P., Engelen-Smit, N. P. E., van der Meer, I. M., America, A. H. P., Mes, J. J., Kootstra, A. M. J., Henket, J. T. M. M., & Mulder, W. J. (2021). Isolation and Gelling Properties of Duckweed Protein Concentrate. *ACS Food Science & Technology*, 1(5), 908–916. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.1c00009>
- Nynäs, A.-L., Berndtsson, E., Newson, W. R., Hövmalm, H. P., & Johansson, E. (2024). Protein Fractionation of Leafy Green Biomass at the Pilot Scale: Partitioning and Type of Nitrogen in the Fractions and Their Usefulness for Food and Feed. *ACS Food Science & Technology*, 4(1), 126–138. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.3c00426>
- Nynäs, A.-L., Newson, W. R., & Johansson, E. (2021). Protein Fractionation of Green Leaves as an Underutilized Food Source—Protein Yield and the Effect of Process Parameters. *Foods*, 10(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/foods10112533>
- OECD-FAO *Agricultural Outlook*. (2022). [dataset]. OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/agr-outl-data-en>
- Pearce, F. G., & Brunke, J. E. (2023). Is now the time for a Rubiscuit or Ruburger?

- Increased interest in Rubisco as a food protein. *Journal of Experimental Botany*, 74(2), 627–637. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac414>
- Pirie, N. W. (1971). *Leaf Protein: Its Agronomy, Preparation, Quality and Use*. International Biological Programme.
- Prade, T., Muneer, F., Berndtsson, E., Nynäs, A.-L., Svensson, S.-E., Newson, W. R., & Johansson, E. (2021). Protein fractionation of broccoli (*Brassica oleracea*, var. Italica) and kale (*Brassica oleracea*, var. Sabellica) residual leaves—A pre-feasibility assessment and evaluation of fraction phenol and fibre content. *Food and Bioproducts Processing*, 130, 229–243. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2021.10.004>
- Ravindran, R., Koopmans, S., Sanders, J. P. M., McMahon, H., & Gaffey, J. (2021). Production of Green Biorefinery Protein Concentrate Derived from Perennial Ryegrass as an Alternative Feed for Pigs. *Clean Technologies*, 3(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/cleantechnol3030039>
- Santamaria-Fernandez, M. (2018). *A Novel Green Biorefinery Concept: Protein refining by lactic acid fermentation and biogas production from green biomass*.
- Santamaría-Fernández, M., & Lübeck, M. (2020). Production of leaf protein concentrates in green biorefineries as alternative feed for monogastric animals. *Animal Feed Science and Technology*, 268, 114605. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114605>
- Santamaría-Fernández, M., Molinuevo-Salces, B., Kiel, P., Steinfeldt, S., Uellendahl, H., & Lübeck, M. (2017). Lactic acid fermentation for refining proteins from green crops and obtaining a high quality feed product for monogastric animals. *Journal of Cleaner Production*, 162, 875–881. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.06.115>
- Sari, Y. W., Mulder, W. J., Sanders, J. P. M., & Bruins, M. E. (2015). Towards plant protein refinery: Review on protein extraction using alkali and potential enzymatic assistance. *Biotechnology Journal*, 10(8), 1138–1157. <https://doi.org/10.1002/biot.201400569>
- Sari, Y. W., Syafitri, U., Sanders, J. P. M., & Bruins, M. E. (2015). How biomass composition determines protein extractability. *Industrial Crops and Products*, 70, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.020>
- Stødkilde, L., Lashkari, S., Eriksen, J., & Jensen, S. K. (2021). Enhancing protein recovery in green biorefineries through selection of plant species and time of harvest. *Animal Feed Science and Technology*, 278, 115016. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.115016>
- Tamayo Tenorio, A., Gieteling, J., de Jong, G. A. H., Boom, R. M., & van der Goot, A. J. (2016). Recovery of protein from green leaves: Overview of crucial steps for utilisation. *Food Chemistry*, 203, 402–408. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.092>
- Wiggering, H., Finckh, M. R., & Heß, J. (2012). *Fachforum Leguminosen: Wissenschaft, Wirtschaft, Gesellschaft - Ökosystemleistungen von Leguminosen wettbewerbsfähig machen: Forschungsstrategie der Deutschen Agrarforschungsallianz*

(Stand 07/2012). Deutsche  
Agrarforschungsallianz (DAFA).

Wilkins, R. J., & Jones, R. (2000). Alternative home-grown protein sources for ruminants in the United Kingdom. *Animal Feed Science and Technology*, 85(1), 23–32.  
[https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(00\)00140-1](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(00)00140-1)

Zhang, W., Grimi, N., Jaffrin, M. Y., Ding, L., & Tang, B. (2017). A short review on the research progress in alfalfa leaf protein separation technology. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 92(12), 2894–2900.  
<https://doi.org/10.1002/jctb.5364>

Zira, S., Salomon, E., Åkerfeldt, M., & Röö, E. (2023). Environmental consequences of pig production scenarios using biomass from rotational grass-clover leys as feed. *Environmental Technology & Innovation*, 30, 103068.  
<https://doi.org/10.1016/j.eti.2023.103068>