



REPUBLIK INDONESIA  
KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA

## SERTIFIKAT PATEN

Menteri Hukum dan Hak Asasi Manusia atas nama Negara Republik Indonesia berdasarkan Undang-Undang Nomor 13 Tahun 2016 tentang Paten, memberikan hak atas Paten kepada:

Nama dan Alamat Pemegang Paten : UPN "VETERAN" JATIM  
Raya Gunung Anyar  
Surabaya

Untuk Inovasi dengan Judul : METODE PRODUKSI KATEKIN MELALUI KULTUR *IN VITRO*  
SUSPENSI *Camellia sinensis*.

Inventor : Dr. Dra. Hj. Sutini, MPd.  
Ir. Susilowati, MT.  
Prof. Dr. dr. M. Rasjad Indra MS

Tanggal Penerimaan : 16 Desember 2016

Nomor Paten : IDP000073213

Tanggal Pemberian : 26 November 2020

Perlindungan Paten untuk inovasi tersebut diberikan untuk selama 20 tahun terhitung sejak Tanggal Penerimaan (Pasal 22 Undang-Undang Nomor 13 Tahun 2016 tentang Paten).

Sertifikat Paten ini dilampiri dengan deskripsi, klaim, abstrak dan gambar (jika ada) dari inovasi yang tidak terpisahkan dari sertifikat ini.



a.n. MENTERI HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA  
DIREKTUR JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL

Dr. Freddy Harris, S.H., LL.M., ACCS.  
NIP. 196611181994031001



(12) PATEN INDONESIA

(11) IDP000073213 B

(19) DIREKTORAT JENDERAL  
KEKAYAAN INTELEKTUAL

(45) 26 November 2020

(51) Klasifikasi IPC<sup>8</sup> : A 61K 36/00, A 61K 31/353  
(21) No. Permohonan Paten : P00201608682  
(22) Tanggal Penerimaan: 16 Desember 2016  
(30) Data Prioritas :  
(31) Nomor (32) Tanggal (33) Negara  
(43) Tanggal Pengumuman: 20 Oktober 2017  
(56) Dokumen Pembanding:  
CN105532460A Method for acquiring golden camellia calli rich in catechin, 4 Mei 2016  
Sutini, IDENTIFIKASI POLIFENOL PADA KULTUR IN VITRO KALUS *Camellia sinensis* UNTUK BAHAN MINUMAN FUNGSIONAL, ejournal.upnjatim, 2013

(71) Nama dan Alamat yang Mengajukan Permohonan Paten :  
UPN "VETERAN" JATIM  
Raya Gunung Anyar  
Surabaya

(72) Nama Inventor :  
Dr. Dra. Hj. Sutini, MPd., ID  
Ir. Susilowati, MT., ID  
Prof. Dr. dr. M. Rasjad Indra MS, ID

(74) Nama dan Alamat Konsultan Paten :

Pemeriksa Paten : Dra. Sri Sulistiyani, M.Si.

Jumlah Klaim : 6

Judul Invensi : METODE PRODUKSI KATEKIN MELALUI KULTUR *IN VITRO* SUSPENSI *Camellia sinensis*.

Abstrak :

Invensi ini berhubungan dengan metode produksi bahan bioaktif katekin melalui kultur in vitro suspensi *Camellia sinensis*. Lebih khusus lagi metode ini dapat menghasilkan katekin dalam skala besar. Langkah-langka yang dilakukan untuk produksi katekin meliputi: 1) sterilisasi alat dan bahan, 2) pembuatan media perlakuan dengan zat pengatur tumbuh, 3) penyediaan pucuk daun *Camellia sinensis* L, 4) inisiasi eksplan dengan menanam potongan pucuk daun teh pada media perlakuan, 5) Induksi kalus *Camellia sinensis* L dilanjutkan dengan sub-kultur, 6) induksi suspensi, dilanjutkan dengan sub-kultur, 5) elisitasi akumulasi senyawa katekin dengan menggunakan elisitor ion nilalanin, dan 6) pemeriksaan pertumbuhan suspensi dilanjutkan uji kualitatif maupun kuantitatif kandungan suspensi katekin. Dengan sukses perwujudan invensi ini, dihasilkan produk katekin dimana produk yang dihasilkan kadarnya sebesar 42,91 ppm.



## DESKRIPSI

### **Bidang Teknik Invensi**

Invensi ini berhubungan dengan metode produksi bahan bioaktif katekin melalui kultur in vitro suspensi *Camelia sinensis*. Lebih khusus lagi metode ini dapat menghasilkan katekin dalam skala besar.

### **Latar Belakang Invensi**

Senyawa metabolit sekunder katekin yang terdapat dalam daun teh mempunyai sifat bioaktif diantaranya berkhasiat sebagai anti diarre. Senyawa katekin ini berperan juga sebagai zat antikanker, anti-inflamasi, dan mengoksidasi lemak untuk menurunkan berat badan (Parris, 2009). Selain itu, orang yang minum satu cangkir teh hijau per hari dapat menurunkan risiko terkena *stroke ischemic* (Colin, 2009).

Semakin berkurangnya lahan perkebunan dapat berdampak pada lahan untuk perkebunan teh khususnya semakin berkurang juga. Oleh karena itu, cara produksi katekin dalam skala besar untuk kebutuhan penduduk sangat diperlukan. Salah satu alternatif untuk memperoleh metabolit sekunder katekin adalah teknik kultur suspensi sel. Teknik kultur suspensi sel dapat berkembang lebih cepat dari pada metabolit yang dipanen dari perkebunan.

Invensi sebelumnya yang berkaitan dengan produksi metabolit sekunder diantaranya metabolit sekunder prosianidin dari kultur sel tanaman *Vaccinium pahalae* (US Patent 20050152839). Invensi lainnya seperti dinyatakan dalam US Patent 5804567 yang berkaitan dengan theaflavin

untuk mengobati penyakit kanker. Sedangkan invensi yang akan diajukan ini menyediakan pembuatan katekin dari eksplan pucuk daun *Camellia sinensis* L., dengan metode kultur *in vitro* berbasis teknik kultur suspensi sel yang dilakukan serba aseptis. Hasil katekin yang didapatkan dapat digunakan sebagai antioksidan untuk obat-obatan dan kosmetik.

#### **Uraian Singkat Invensi.**

Sesuai invensi ini menyediakan metode produksi katekin dengan teknik kultur *in vitro* suspensi sel. Tahapan produksinya meliputi tahap-tahap: 1) sterilisasi alat dan bahan, 2) pembuatan media perlakuan dengan zat pengatur tumbuh, 3) penyediaan pucuk daun *Camellia sinensis* L, 4) inisiasi eksplan dengan menanam potongan pucuk daun teh pada media perlakuan, 5) Induksi kalus *Camellia sinensis* L dilanjutkan dengan sub-kultur, 6) induksi suspensi *Camellia sinensis* L., dilanjutkan dengan sub-kultur, 5) elisitasi akumulasi senyawa katekin dengan menggunakan elisitor ion fenilalanin, dan 6) pemeriksaan pertumbuhan suspensi dilanjutkan uji kualitatif maupun kuantitatif kandungan suspensi katekin.

Sterilisasi alat-alat dan bahan dilakukan di dalam autoklaf. Media nutrisi yang digunakan adalah media Murashige & Skoog (MS) yang dimodifikasi dengan penambahan kinetin dan 2,4-D.

#### **Uraian Lengkap Invensi**

Invensi ini dimulai dengan sterilisasi semua bahan dan alat di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 9 menit tekanan 1 (satu) atmosfer. Sterilisasi ruangan maupun tempat inokulasi dengan menggunakan lampu ultraviolet.

Sterilisasi sangat penting untuk mencegah kontaminasi bakteri maupun jamur pada proses produksi.

Media nutrisi yang digunakan media MS yang dimodifikasi dengan penambahan kinetin dan 2,4-D. Pembuatan media padat adalah sebagai berikut: erlenmeyer 500 mL diisi makronutrien MS yang berisi: ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1650 mg/L,  $\text{KNO}_3$  1900 mg/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  440 mg/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  370 mg/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  170 mg/L) ditambah mikronutrien MS ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  27,8 mg/L,  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  37,3mg/L,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  6,2 mg/L,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  22,3mg/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  8,6mg/L, KI 0.83mg/L,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,25 mg/L,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,025 mg/L) ditambah myoinositol 100mg/L ditambah Vitamin B5 0.5-2 mg/L ditambah Sucrosa 20 gram/L. Selanjutnya diatur pH nya pada 5,8 dengan penambahan larutan NaOH 0,1N atau HCl 0,1N dengan menggunakan pH meter, kemudian ditambahkan bubuk agar sebanyak 4 gram kemudian dipanaskan sambil diaduk dengan *stirer* hingga mendidih. Untuk media suspensi bahan yang digunakan hampir sama dengan media padat tanpa penambahan agar-agar. Larutan medium panas kemudian dimasukkan ke dalam botol kultur masing-masing botol sebanyak 12,5 mL medium. Selanjutnya botol kultur berisi medium MS yang telah dimodifikasi ditutup dengan aluminium foil dan disterilisasi di autoklaf.

Bahan eksplan yang digunakan adalah pucuk daun teh yang diperoleh dari perkebunan. Eksplan dipetik dari pucuk daun teh posisi 1, 2 dan 3 dari kebun dicuci dengan air yang mengalir sampai bersih. Selanjutnya direndam dalam larutan *dithane* dan *agrept* 2 gram/L selama 20 menit untuk mematikan jamur. Selanjutnya proses dilakukan di *laminar air flow* (LAF) pucuk daun direndam sambil dikocok pelan dalam larutan berbahan aktif 5,25% NaClO selama 30 menit. Selanjutnya dibilas dengan akuades steril, sambil dikocok pelan selama 5 menit, ulangi kegiatan ini 3 kali. Daun

tanpa tulang dan tepi steril dipindahkan pada cawan petri, kemudian daun dipotong-potong dengan ukuran 0,5-1 cm. Potongan daun ditanam pada botol kultur, sebanyak 4-5 eksplan. Botol kultur diinkubasi di ruang terang pada suhu 25°C dan diamati kemampuannya untuk membentuk kalus dan kalus yang terbentuk disubkultur. Kalus yang disubkulturkan dipilih bagian yang berwarna putih kehijauan karena pada bagian tersebut sel-selnya masih aktif mengalami pembelahan. Subkultur dilakukan dengan cara memindahkan kalus pada media baru secara aseptis diinkubasi dalam ruang kultur pada suhu 25°C selama 4 minggu dengan pencahayaan untuk pemeliharaan kalus dan perbanyakkan. Kalus hasil perbanyakkan dipindahkan ke media suspensi, dan dielisisasi dengan ion fenilalanin sebanyak 4 ppm. Setelah umur 4 minggu dari masa elisitasi, dipanen dengan cara mengeluarkan dari botol, ditiriskan di tisu kemudian ditimbang, didapat berat basah dan setelah pengeringan didapat berat kering. Hasil yang diperoleh dari berat kering ini merupakan hasil produksi katekin yang dalam penggunaannya perlu diekstrak untuk mendapatkan kadarnya. Penentuan kadar katekin menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi / HPLC. Kadar katekin dengan HPLC didapat kadar sebesar 42,91ppm.

**Klaim**

1. Metode produksi katekin menggunakan teknik kultur *in vitro* sesuai langkah-langkah sebagai berikut:
  - a). Sterilisasi alat di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 9 menit tekanan satu atmosfer dan sterilisasi bahan menggunakan larutan *benomyl*, *agrept* dan NaClO;
  - b). Pembuatan media perlakuan dengan zat pengatur tumbuh kinetin dan 2,4-D;
  - c). Inisiasi eksplan dengan menanam potongan pucuk daun *Camellia sinensis* L pada media perlakuan;
  - d). Induksi kalus *Camellia sinensis* L dilanjutkan dengan subkultur;
  - e). Induksi suspensi *Camellia sinensis* L dilanjutkan dengan subkultur;
  - f). Elisitasi suspensi *Camellia sinensis* L dengan menggunakan fenilalanin; dan
  - g). Pemeriksaan pertumbuhan suspensi dilanjutkan ujikandungan suspensi secara kualitatif-kuantitatif dengan HPLC.
2. Metode produksi katekin dengan teknik kultur *in vitro* sesuai dengan klaim 1, dimana sterilisasinya menggunakan *benomyl* dan *agrept* 2 gram/L dan NaClO 5,25%.
3. Metode produksi katekin dengan teknik kultur *in vitro* sesuai dengan klaim 1 dan 2 menggunakan zat pengatur tumbuh kinetin dan 2,4-D.
4. Metode produksi katekin dengan teknik kultur *in vitro* sesuai dengan klaim 1 dan 3, memerlukan potongan pucuk daun teh seluas 1cm<sup>2</sup>.
5. Metode produksi katekin dengan teknik kultur *in vitro* sesuai dengan klaim 1- 4, dimana elisitor yang digunakan adalah fenilalanin .

6. Metode produksi katekin dengan teknik kultur *in vitro* sesuai dengan klaim 1 hingga 5 menghasilkan kadar katekin sebesar 42,91 ppm.

**ABSTRAK****METODE PRODUKSI KATEKIN MELALUI KULTUR *IN VITRO*  
SUSPENSI *Camellia sinensis*.**

Invensi ini berhubungan dengan metode produksi bahan bioaktif katekin melalui kultur in vitro suspensi *Camellia sinensis*. Lebih khusus lagi metode ini dapat menghasilkan katekin dalam skala besar. Langkah-langka yang dilakukan untuk produksi katekin meliputi: 1) sterilisasi alat dan bahan, 2) pembuatan media perlakuan dengan zat pengatur tumbuh, 3) penyediaan pucuk daun *Camellia sinensis* L, 4) inisiasi eksplan dengan menanam potongan pucuk daun teh pada media perlakuan, 5) Induksi kalus *Camellia sinensis* L dilanjutkan dengan sub-kultur, 6) induksi suspensi, dilanjutkan dengan sub-kultur, 5) elisitasi akumulasi senyawa katekin dengan menggunakan elisitor ion fenilalanin, dan 6) pemeriksaan pertumbuhan suspensi dilanjutkan uji kualitatif maupun kuantitatif kandungan suspensi katekin. Dengan proses perwujudan invensi ini, dihasilkan produk katekin dimana produk yang dihasilkan kadarnya sebesar 42,91 ppm.