



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 14 Tahun 2001 tentang Paten, memberikan Paten kepada:

Nama dan Alamat Pemegang Paten : UPN VETERAN JATIM
Jl. Raya Rungkut Madya Gunung Anyur
Sumbaya 60111
INDONESIA

Untuk Invensi dengan Judul : METODE PRODUKSI EPICATECHIN *gallate* MELALUI
KULTUR *IN VITRO* KALUS *CAMELLIA sinensis* L.

Inventor : Dra. Sutini, MPd.
Prof. Sutiman B. Sumitro, SU, DSc
Ir. Cholid Rifho, MS
Prof. Ir. Tutik Wardiyati, PhD

Tanggal Penerimaan : 23 Desember 2009

Nomor Paten : IDP000041822

Tanggal Pemberian : 17 Mei 2016

Perlindungan Paten untuk invensi tersebut diberikan untuk selama 20 tahun terhitung sejak Tanggal Penerimaan (Pasal 8).

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



10-2016-234000

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

u.b.
Direktur Paten, Desain Tata Letak
Sirkuit Terpadu dan Rahasia Dagang.

Ir. Timbul Sinaga, M.Hum.
NIP. 196202021991031001

Deskripsi

METODE PRODUKSI *EPICATECHIN gallate* MELALUI KULTUR *INVITRO* KALUS *CAMELLIA sinensis* L.

Bidang Teknik Invensi

Invensi ini berhubungan dengan metode produksi bahan bioaktif *Epicatechin gallate* (ECG) dimana ECG tersebut dapat secara aktif memiliki aktivitas anti oksidatif (Caffin dkk., 2004), lebih khusus lagi ECG sebagai bahan bioaktif tersebut dapat diproduksi melalui kultur in vitro kalus *Camellia sinensis* L dalam skala besar.

Latar Belakang Invensi

ECG adalah metabolit sekunder yang terdapat dalam daun teh muda (Peter, 2002) sebagai bahan bioaktif memiliki kasiat anti obesitas. Senyawa ECG ini berperan sebagai zat untuk menghancurkan lemak (Rahardjo, 2005), juga antioksidan yang memberikan efek penetralisasi kuat terhadap senyawa radikal bebas endogen dan eksogen (Murphy Coman, 1999). Radikal bebas tersebut menyerang sistem intraseluler dalam berbagai jaringan tubuh. Itulah yang menyebabkan munculnya tumor, kanker, dan berbagai penyakit degeneratif lainnya. Menurut Khomsan, Guru Besar Departemen Gizi Masyarakat dan Sumber Daya Keluarga Institut Pertanian Bogor, ECG adalah antioksidan yang kekuatannya 100 kali lebih efektif dibandingkan vitamin C dan 25 kali lebih tinggi dibandingkan vitamin E.

Kendala ketersediaan tanaman yang dipengaruhi musim, dengan curah hujan (1075-5450 mm tahun⁻¹), suhu 24.4°C (Williges, 2004), kadar senyawa yang relatif rendah sekitar 1 % (Ruan, 2005) memerlukan lahan luas, memerlukan pemeliharaan intensif seperti penyiangan, pemangkasan, pemberantasan gulma, pemberantasan hama-penyakit (Setiti Edy, 2000) maka biaya pembudidayaan akan mahal. Oleh karena itu produksi metabolit sekunder ECG perlu dikembangkan dengan teknik kultur *in vitro*. Teknik ini mempunyai keuntungan dalam produksi metabolit dibandingkan dengan tanaman utuh karena kecepatan pertumbuhan sel dan biosintesis dalam kultur yang diinisiasi dari eksplan sangat tinggi dan dalam periode yang sangat singkat. Beberapa keuntungan dari pemakaian teknik kultur *in vitro* untuk produksi metabolit sekunder antara lain: tidak tergantung musim, sistem produksi dapat diatur sesuai kebutuhan, lebih konsisten, dan mengurangi penggunaan lahan (Watimena, 1992). Kultur *in vitro* juga lebih ekonomis untuk tanaman yang memerlukan waktu lama untuk mencapai maturitas.

Invensi sebelumnya yang dikemukakan oleh Chattopadhyay, et. al (US Patent 6620599) adalah pembuatan *catechin* yang merupakan monomer ECG dari *Taxus wallichiana* dengan metode kultur sel menghasilkan produk sebesar 0.3%. Metode pembuatan *catechin* invensi yang dilakukannya adalah: (a) inokulasi eksplan pada media MS dengan kombinasi auksin (1-5mg/l) dan sitokinin (0.1-1.0mg/l) (b) inisiasi kalus dengan penyinaran selama 4-6 minggu, diikuti dengan subkultur (c) ekstraksi kalus dengan pelarut polar pada suhu kamar (d) penguapan pelarut polar (e) pencucian dengan klorinasi, dilanjutkan dengan isolasi senyawa *catechin* dengan penyaringan.

Invensi lain oleh Lila et. al (US Patent 20050152839) tahun 2005 tentang metode isolasi catechin dan epicatechin melalui kultur sel dari tanaman *Vaccinium pahalae*. Hasil kultur ini diaplikasikan pada sel hewan sebagai penghambat pertumbuhan tumor. Paten yang terdahulu oleh Bailey et. al tahun 1999 bernomor 6210679 dari United States Patent tentang isolasi EGCG dengan berbagai macam metode ekstraksi menghasilkan kemurnian EGCG mencapai 95-98%. Contoh paten oleh Hara dan Yukihiko tahun 1984 NO. 4613672 United States Patent, tentang metode produksi ECG dari ekstraksi daun teh, menggunakan pelarut air panas, methanol, ethanol atau acetone, pencucian ekstrak daun teh dengan chloroform, dielusi dan ECG dianalisis dengan HPLC.

Invensi yang akan diajukan ini menyediakan pembuatan ECG dari eksplan pucuk daun *Camellia sinensis* L, yang menghasilkan produk berupa kalus ECG mencapai kadar sebesar 0.0435 %.

Uraian Singkat Invensi.

Obyek yang dihasilkan invensi ini menyediakan metode produksi bahan bioaktif *Epicatechin gallate* (ECG) yang mempunyai keuntungan dalam produksi metabolit dibandingkan dengan tanaman utuh karena kecepatan pertumbuhan sel dan biosintesis dalam kultur yang diinisiasi dari eksplan sangat tinggi dan dalam periode yang sangat singkat. Kultur in vitro dipelihara di bawah kondisi lingkungan dan nutrisi yang terkontrol, menjamin menghasilkan metabolit yang kontinyu merupakan prasyarat terhadap aplikasi komersial dari sistem kultur ini. Langkah-langkah yang dilakukan dalam metode kultur in vitro adalah: (1) sterilisasi alat dan bahan, (2) pembuatan media perlakuan dengan zat pengatur tumbuh (3) inisiasi eksplan dengan menanam potongan pucuk daun teh pada media perlakuan (4) induksi kalus ECG dilanjutkan dengan subkultur. (5) Elisitasi akumulasi senyawa ECG dengan menggunakan elisitor ion logam Cu^{2+} (6) Pemeriksaan pertumbuhan kalus dilanjutkan uji kualitatif maupun kuantitatif kandungan kalus ECG.

Metode produksi ECG dengan teknik kultur *in vitro* ini, dimana sterilisasinya menggunakan benomyl 2 gram/L dan NaClO 5,25%, zat pengatur tumbuh yang digunakan adalah 2,4-D sebesar 1mg/L dan kinetin sebesar 1mg/L, potongan pucuk daun teh yang digunakan adalah pucuk daun pada posisi 1-3 dari tangkainya seluas 1cm², elisitor yang digunakan adalah ion logam Cu²⁺ sebanyak 10 ppm, diharapkan dapat meningkatkan produk kalus.

Uraian Lengkap Invensi

Sterilisasi alat-alat dan bahan dilakukan di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 9 menit tekanan 1 (satu) atmosfer. Sterilisasi sangat penting untuk mencegah kontaminasi bakteri maupun jamur pada proses produksi. Media nutrisi yang digunakan media MS yang dimodifikasi dengan penambahan 2,4-D 1mg/L dan kinetin 1mg/L. Pembuatan media adalah sebagai berikut: erlenmeyer 500 mL diisi makronutrien Murashige & Skoog (MS) yang berisi : (NH₄NO₃ 1650 mg/L, KNO₃ 1900 mg/L, CaCl₂·2H₂O 440 mg/L, MgSO₄·7H₂O 370 mg/L, KH₂PO₄ 170 mg/L) ditambah mikronutrien MS (FeSO₄·7H₂O 27,8 mg/L, Na₂EDTA·2H₂O 37,3mg/L, H₃BO₃ 6,2 mg/L, MnSO₄·4H₂O 22,3mg/L, ZnSO₄·7H₂O 8,6mg/L, KI 0.83mg/L, Na₂MoO₄·2H₂O 0,25 mg/L, CuSO₄·5H₂O 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 atau HCl encer dengan menggunakan pH meter, kemudian ditambahkan bubuk agar sebanyak 4 gram kemudian dipanaskan sambil diaduk dengan stirer hingga mendidih. Larutan medium panas kemudian dimasukkan kedalam botol kultur masing-masing botol sebanyak 12,5 mL medium. Selanjutnya botol kultur berisi medium MS ditutup dengan aluminium foil dan disterilisasi.

Bahan eksplan yang digunakan adalah pucuk daun teh yang diperoleh dari perkebunan Wonosari Lawang. Eksplan dipetik dari pucuk daun teh posisi 1,2 dan 3 dari kebun dicuci dengan air yang mengalir sampai bersih. Selanjutnya direndam dalam larutan 2 gram/L benomyl 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 steril dipindahkan pada cawan petri, hilangkan tulang dan tepi daun, kemudian daun dipotong-potong 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 dapat ditingkatkan kadarnya melalui berbagai cara di antaranya dengan: perlukaan (Mondal, dkk. 2004), radiasi, sinar, diberi patogen jamur, pertumbuhan diganggu lewat pengurangan nutrisi, elisitasi dengan asam salisilat dan penambahan toksin logam. Menurut Lincoln Taiz (2002), ion logam yang ditambahkan pada medium hara yang dipadatkan dengan agar menyebabkan tanaman stres, akan memacu kultur kalus menghasilkan senyawa metabolit sekunder seperti ECG. 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 kalus, selanjutnya diuji kualitatif dan kuantitatif dengan HPLC menggunakan fase diam berupa kolom RP 18 dan fase gerak yang terdiri dari metanol, aquades, asam asetat sebesar 20:75:5 v/v, dengan suhu HPLC sebesar 30°C.

Klaim

1. Metode produksi ECG 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 dan NaClO,
 - b). Pembuatan media perlakuan dengan zat pengatur tumbuh 2,4-D dan kinetin,
 - c). Menyediakan pucuk daun *Camellia sinensis*,
 - d). Inisiasi eksplan dengan menanam potongan pucuk daun *Camellia sinensis* pada media perlakuan,
 - e). Induksi kalus *Camellia sinensis* dilanjutkan dengan subkultur,
 - f). Elisitasi kalus *Camellia sinensis* dg menggunakan elisitor ion logam Cu²⁺
 - g). Pemeriksaan pertumbuhan kalus dilanjutkan uji kualitatif dengan HPLC,
 - h). Uji kuantitatif kandungan kalus ECG dengan HPLC,
2. Metode produksi ECG dengan teknik kultur in vitro sesuai dengan klaim 1, dimana sterilisasinya menggunakan benomyl 2-5 gram/L dan NaClO 5,25%.
3. Metode produksi ECG dengan teknik kultur in vitro sesuai dengan klaim 1 dan 2, dimana zat pengatur tumbuh yang digunakan adalah 2,4-D sebesar 1-5 mg/L dan kinetin sebesar 1-4 mg/L.
4. Metode produksi ECG dengan teknik kultur in vitro sesuai dengan klaim 1 dan 3, dimana potongan pucuk daun teh yang digunakan adalah pucuk daun pada posisi 1-3 dari tangkainya seluas 1-1,5 cm².
5. Metode produksi ECG dengan teknik kultur in vitro sesuai dengan klaim 1- 4, dimana elisitor yang digunakan adalah elisitor ion logam Cu²⁺.
6. Metode produksi ECG dengan teknik kultur in vitro sesuai dengan klaim 1- 5, dimana elisitor yang digunakan adalah elisitor ion logam Cu²⁺ sebanyak 10-15 ppm.
7. Metode produksi ECG dengan teknik kultur in vitro sesuai dengan klaim 1- 6, dimana produk yang dihasilkan sebesar 0.0435 %.

Abstrak

METODE PRODUKSI *EPICATECHIN gallate* MELALUI KULTUR *INVITRO* KALUS *CAMELLIA sinensis* L.

Invesi ini berhubungan dengan metode produksi ECG dimana ECG tersebut dapat secara aktif menghambat diferensiasi sel-sel adiposa pada jaringan lemak, lebih khusus lagi ECG sebagai bahan bioaktif tersebut dapat diproduksi melalui kultur in vitro kalus *Camellia sinensis* L dalam skala besar, yang meliputi langkah-langkah berikut:

- a). Sterilisasi alat di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 9 menit tekanan satu atmosfer dan sterilisasi bahan menggunakan larutan benomyl dan NaClO,
- b). Pembuatan media perlakuan dengan zat pengatur tumbuh 2,4-D dan kinetin,
- c). Menyediakan pucuk daun *Camellia sinensis*,
- d). Inisiasi eksplan dengan menanam potongan pucuk daun *Camellia sinensis* pada media perlakuan,
- e). Induksi kalus *Camellia sinensis* dilanjutkan dengan subkultur,
- f). Elisitasi kalus *Camellia sinensis* dg menggunakan elisitor ion logam Cu²⁺
- g). Pemeriksaan pertumbuhan kalus dilanjutkan uji kualitatif dengan HPLC,
- h). Uji kuantitatif kandungan kalus ECG dengan HPLC,

Metode produksi ECG dengan teknik kultur in vitro ini, dimana sterilisasinya menggunakan benomyl 2-5 gram/L dan NaClO 5,25%, zat pengatur tumbuh yang digunakan adalah 2,4-D sebesar 2,4-D sebesar 1-5 mg/L dan kinetin sebesar 1-4 mg/L.

dan kinetin sebesar 1mg/L, potongan pucuk daun teh yang digunakan adalah pucuk daun pada posisi 1-3 dari tangkainya seluas 1-1,5 cm², elisitor yang digunakan adalah ion logam Cu²⁺ sebanyak 10-15 ppm. Dengan proses perwujudan invensi ini, dihasilkan produk ECG sebesar 0.0435 % .