

**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 Invensi dengan Judul : METODE PRODUKSI POLIFENON MELALUI KULTUR *IN VITRO* SUSPENSI *CAMELLIA SINENSIS L.*

Inventor : Dr.Dra. Hj. Sutini, MPd
Ir. Nana Dyah Siswati, M.Kes
Prof. Dr. dr. M. Rasjad Indra MS
Prof.Djoko Agus Purwanto,Apt., M.Si

Tanggal Penerimaan : 04 Desember 2015

Nomor Paten : IDP000069494

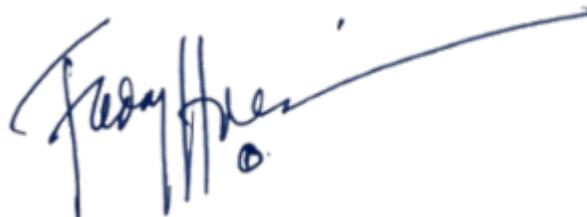
Tanggal Pemberian : 06 Juli 2020

Perlindungan Paten untuk invensi 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 invensi 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) IDP000069494 B

(19) DIREKTORAT JENDERAL
KEKAYAAN INTELEKTUAL

(45) 06 Juli 2020

(51) Klasifikasi IPC⁸ : C 12N 5/00, A 61K 36/82
// (C 12N 5:00)

(21) No. Permohonan Paten : P00201508172

(22) Tanggal Penerimaan: 04 Desember 2015

(30) Data Prioritas :
(31) Nomor (32) Tanggal (33) Negara

(43) Tanggal Pengumuman: 30 Desember 2016

(56) Dokumen Perbandingan:
D1: flavan-3-ol in vitro culture camellia sinensis
contributions in order ...
ejournal.upnjatim.ac.id/index.php/teknologi-pangan/article/download/467/365
D2: Untitled - Fakultas Sains Dan Teknologi UIN
Malang saintek.uin-malang.ac.id/wp-content/uploads/2014/05/371-374.p

(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. Nana Dyah Siswati, M.Kes, ID
Prof. Dr. dr. M. Rasjad Indra MS, ID
Prof.Djoko Agus Purwanto,Apt., M.Si, ID

(74) Nama dan Alamat Konsultan Paten :

Pemeriksa Paten : Dra. Ita Yukimartati, M.Si.

Jumlah Klaim : 5

(54) Judul METODE PRODUKSI POLIFENON MELALUI KULTUR *IN VITRO* SUSPENSI *CAMELLIA SINENSIS*
Invensi : L.

(57) Abstrak :

Investasi ini berhubungan dengan metode produksi polifenon melalui kultur *in vitro*. Polifenon hasil dari metode kultur *in vitro* ini sangat bermanfaat pada berbagai bidang industri. Manfaat pada industri kesehatan diantaranya untuk: (1) anti aging, (2) mencegah sakit perut, (4) berperan untuk mengurangi berat badan (5) menghambat kanker perut, (6) menghambat salmonella (7) terlibat dalam regulasi tekanan darah, (8) menurunkan kolesterol, (9) atstringen, anti karsinogenik pada kulit dan dapat sebagai bahan aktif utama pencerah kulit/kosmetika. Keunggulan metode produksi polifenon melalui kultur *in vitro* ini diantaranya tidak memerlukan lahan luas, namun bisa dilakukan pada suatu tempat tertentu yang terbatas. Potensi komersialisasi polifenol dibidang pertanian dapat sebagai alelopati/pencegah gulma, sedangkan pada tehlogi pangan dapat sebagai pewarna alami, dan rasa kelat. Pada home industri sebagai bahan minuman fungsional. Potensi komersialisasi ini disamping meningkatkan potensi pendapatan daerah juga akan meningkatkan komoditi ekspor negara.

Deskripsi

METODE PRODUKSI POLIFENON MELALUI KULTUR *IN VITRO* SUSPENSI *CAMELLIA SINENSIS L.*

Bidang Teknik Invensi

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

Latar Belakang Invensi

Polifenon adalah metabolit sekunder yang terdapat dalam daun teh muda (Peter, 2002) sebagai bahan bioaktif memiliki kasiat anti obesitas. Senyawa Polifenon ini berperan juga sebagai zat untuk pengkelat/anti diarre, dapat meningkatkan kadar nitrite oxide (NO) dan reactive oxigen intermediate (ROI) pada kultur makrofag, menurunkan jumlah bakteri dalam jaringan hati (Susilaningsih N, dkk.2005). Selain itu dapat sebagai anti oksidan yang memberikan efek menangkap dengan kuat senyawa radikal bebas endogen dan eksogen (Narendra R. V, et. al 2007). Radikal bebas tersebut menyerang sistem intraseluler dalam berbagai jaringan tubuh. Radikal bebas ini menyebabkan rusaknya DNA dan memicu munculnya kanker, menyebabkan penggumpalan darah, ataupun arterosklerosis juga penyakit degeneratif lainnya (Aristiarini Agnes, 2012)

Perubahan iklim menyebabkan frakmentasi lahan perkebunan, peledakan penduduk juga mengakibatkan penciptaan lahan perkebunan (Arifin, M. 2014). Frakmentasi dan penciptaan lahan perkebunan ini akan menghambat produktifitas metabolit sekunder polifenon yang didapat dari lahan. Oleh karena itu produksi metabolit sekunder polifenon pada invensi ini perlu dikembangkan dengan teknik kultur *in vitro*. Teknik kultur *in vitro* tidak memerlukan lahan luas, namun bisa dilakukan pada suatu tempat tertentu yang terbatas. Disamping itu kultur sel

yang diinisiasi dari eksplan yang sesuai akan berkembang lebih cepat dan dapat dipanen dalam periode yang sangat singkat.

Invensi sebelumnya yang dikemukakan oleh Pius K.P, et. al (Indian Patent 214427) adalah pembuatan polifenol yang disari dari daun the hijau menggunakan pelarut etilasetat dan kloroform untuk menghilangkan kafein dari larutan yang akan digunakan untuk anti oksidan. Invensi lain yang dilakukan oleh Venkatramesh M, et. Al (2012) dengan nomor paten United States Patent 20120021080 diproduksi polifenon dari kultur suspensi tanaman *Theobroma* and *Herrania* yang bebas dari kafein.

Invensi yang dilakukan oleh Yuko, F. et. al (WO 2007/00 4659 A 1) tahun 2007 tentang metode analisis prosianidin dengan langkah langkah: a) pretreating sampel uji menggunakan kolom untuk menghilangkan kontaminan yang mempengaruhi analisis prosianidin dan flavan-3-ol, b)menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC) untuk memisahkan dan mengukur prosianidin dan flavan-3-ol dalam larutan untuk menghilangkan kontaminan yang ada pada langkah a. Paten yang terdahulu oleh Bailey et. al tahun 1999 berbagai macam metode ekstraksi menghasilkan kemurnian polifenon mencapai 95-98%. Paten oleh inventor Hara dan Yukihiro tahun 1984 dari United States Patent NO. 4613672, tentang metode produksi polifenon dari ekstraksi daun teh, menggunakan pelarut air panas, methanol, ethanol atau acetone, pencucian ekstrak daun teh dengan chloroform, dianalisis dengan HPLC menghasilkan polifenon.

Invensi yang akan diajukan ini menyediakan pembuatan polifenon dari eksplan pucuk daun *Camellia sinensis* L, dengan metode kultur *in vitro* berbasis teknik kultur suspensi sel yang dilakukan serba aseptis akan menghasilkan produk berupa polifenon.

Uraian Singkat Invensi.

Metode produksi polifenon dengan teknik kultur *in vitro* ini, sterilisasinya menggunakan dithane & agrept 2 gram/L dan NaClO 5,25%, zat pengatur tumbuh yang digunakan adalah BAP sebesar 3 mg/L dan 2-4 D sebesar 3 mg/L, potongan pucuk daun teh yang digunakan adalah pucuk daun pada posisi 1-3 dari tangkainya seluas 1cm², elisitor yang digunakan adalah ion logam Co sebanyak 4 ppm, diharapkan dapat meningkatkan produk suspense.

Infensi ini bertujuan untuk menyediakan metode produksi bahan bioaktif polifenon dalam periode yang sangat singkat. Metode Kultur *in vitro* diinkubasi dalam lingkungan yang terkontrol sehingga diperoleh metabolit yang diharapkan. Langkah-langkah yang dilakukan dalam metode kultur *in vitro* adalah: (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 subkultur, (6) induksi suspense *Camellia sinensis* L, dilanjutkan dengan subkultur. (5) Elisitasi akumulasi senyawa polifenon dengan menggunakan elisitor ion logam Co. (6) Pemeriksaan pertumbuhan suspense dilanjutkan uji kualitatif maupun kuantitatif kandungan suspense polifenon.

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 BAP dan 2,4-D masing-masing 3 mg/L.

Uraian Singkat Gambar

Gambar 1. Adalah indeks Pertumbuhan Kultur suspensi dengan ion logam Co.

Gambar 2. Adalah Kromatogram senyawa standar polifenon dan luasan area dari kromatogram.

Gambar 3. Kromatogram senyawa sampel kultur suspense dan luasan area dari kromatogram sampel.

Uraian Lengkap Invensi

Steririlasi alat-alat dan bahan dilakukan 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 BAP 3mg/L dan dan 2,4-D 3mg/L. Pembuatan media padat 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. Untuk media suspense bahan yang digunakan hampir sama dengan media padat tanpa penambahan agar-agar. Larutan medium panas kemudian dimasukkan kedalam 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 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 dithane & 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 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 dipindahkan ke media suspensi, dan dielisisasi dengan ion logam Co 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. Kemudian dievaluasi pertumbuhannya dengan parameter indeks pertumbuhan (IP). Hasil perhitungan dan histogram IP polifenon dengan elisitor dapat dilihat Gambar 1

Penetapan kadar ekstrak suspense dengan High-performance liquid chromatography (HPLC) dengan tahapan seperti tersebut dbawah.

a. Pembuatan Standar polifenon.

Standar polifenon dibuat larutan dengan konsentrasi 50 ppm. Larutan yang didapat kemudian disaring dengan penyaring *Whatman* dengan diameter pori 0,2 μm , lalu disuntikkan pada HPLC sebanyak 20 μl melalui injektor dan dielusi dengan kondisi HPLC yang terpilih, menghasilkan profil kromatogram standar polifenon (Gambar 2). Dari puncak-puncak tersebut, diperoleh data waktu retensi. Waktu retensi dapat digunakan

untuk analisis kualitatif sedangkan kromatogram tinggi puncak atau area puncak dapat digunakan untuk analisis kuantitatif.

b. Ekstraksi suspensi sampel

Ekstrak suspensi sampel yang diperoleh dilarutkan dalam metanol kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 5 ml. Larutan yang didapat kemudian disaring dengan penyaring *Whatman* dengan diameter pori 0,2 μm , lalu disuntikkan pada HPLC sebanyak 20 μl melalui injektor dan dielusi dengan kondisi HPLC yang terpilih. Dari puncak-puncak tersebut, diperoleh data waktu retensi. Waktu retensi dapat digunakan untuk analisis kualitatif sedangkan kromatogram tinggi puncak atau area puncak dapat digunakan untuk analisis kuantitatif (Gambar 3).

c. Contoh perhitungan Penentuan Kadar polifenon

Contoh perhitungan Penentuan Kadar polifenon menggunakan data kromatogram & area dari sampel maupun standar polifenon. Perhitungan kadar polifenon mengikuti metode Mustafa, R.A. et. al (2010) perhitungan sebagai berikut:

$$\text{Kadar sampel} = \frac{\text{Kromatogram area sampel}}{\text{Kromatogram area standar}} \times \text{konsentrasi standar polifenon}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar sampel} &= \frac{12.27}{158.13} \times 50 \text{ ppm} \\ &= 3.87 \text{ ppm} \end{aligned}$$

Klaim

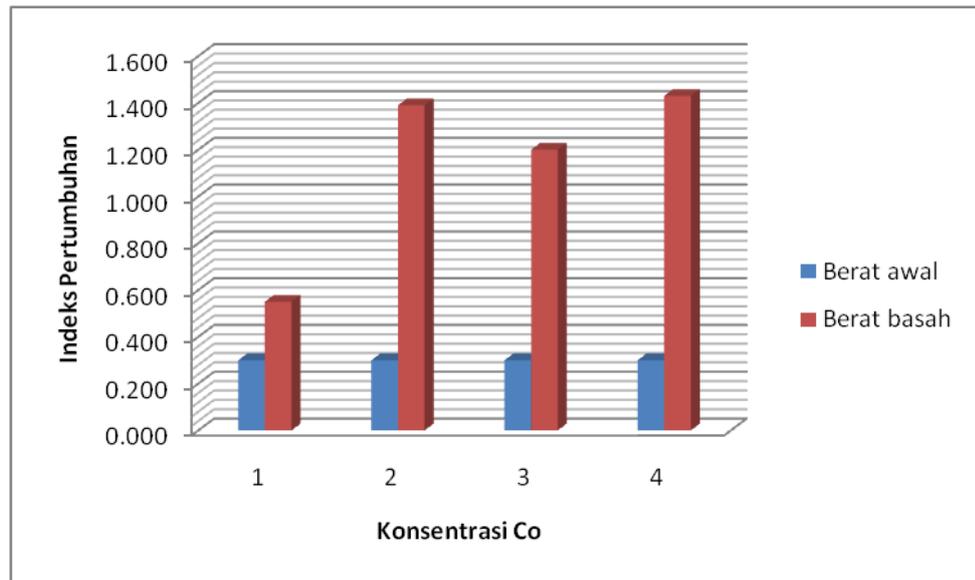
1. Metode produksi polifenon menggunakan teknik kultur *in vitro* sesuai langkah-langkah sebagai berikut:
 - a). Sterilisasi alat di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 9 menit tekanan satu atmosfer dan sterilisasi bahan menggunakan larutan dithane, agrept dan NaClO,
 - b). Pembuatan media perlakuan dengan zat pengatur tumbuh BAP 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 ion logam Co ,
 - g). Pemeriksaan pertumbuhan suspensi dilanjutkan ujikandungan suspensi secara kualitatif-kuantitatif dengan HPLC,
2. Metode produksi polifenon dengan teknik kultur *in vitro* sesuai dengan klaim 1, dimana sterilisasinya menggunakan dithane & agrept 2 gram/L dan NaClO 5,25%.
3. Metode produksi polifenon dengan teknik kultur *in vitro* sesuai dengan klaim 1 dan 2, dimana zat pengatur tumbuh yang digunakan adalah BAP sebesar 3mg/L dan 2,4-D sebesar 3 mg/L.
4. Metode produksi polifenon 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 1cm² .
5. Metode produksi polifenon dengan teknik kultur *in vitro* sesuai dengan klaim 1- 4, dimana elisitor yang digunakan adalah ion logam Co sebanyak 4 ppm.
6. Metode produksi polifenon dengan teknik kultur *in vitro* sesuai dengan klaim 1- 5, dimana produk yang dihasilkan kadarnya sebesar 3.87 ppm.

ABSTRAK**METODE PRODUKSI POLIFENON MELALUI KULTUR *IN VITRO* SUSPENSI
*CAMELLIA SINENSIS L.***

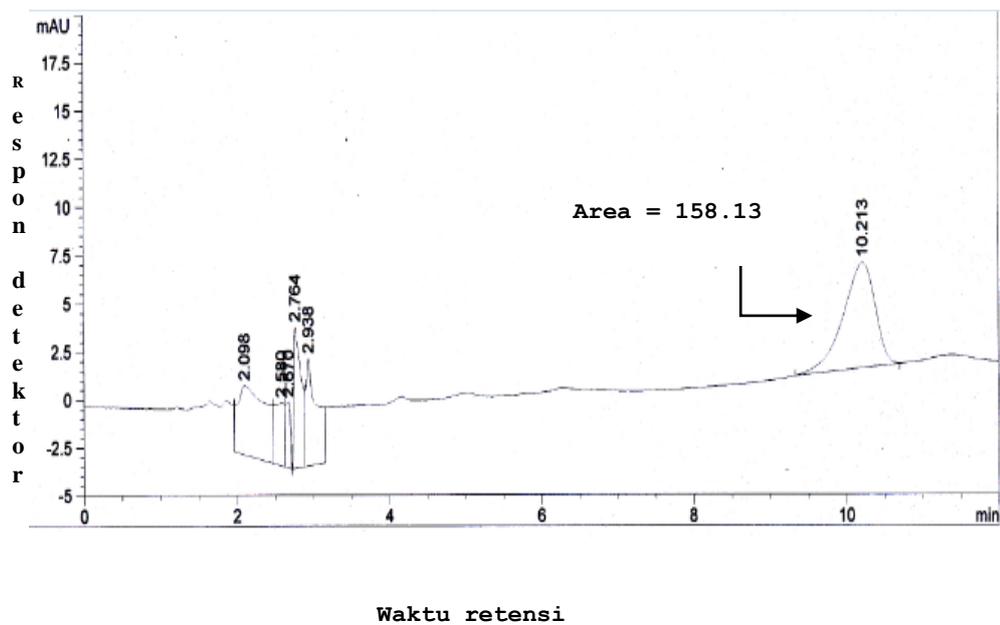
Invesi ini berhubungan dengan metode produksi polifenon dimana polifenon tersebut dapat secara aktif berperan juga sebagai zat untuk pengkelat/anti diarehe, lebih khusus lagi polifenon sebagai bahan bioaktif tersebut dapat diproduksi melalui kultur *in vitro suspensi Camellia sinensis L* dalam skala besar, yang meliputi langkah-langkahberikut:

- a). Sterilisasi alat di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 9 menit tekanan satu atmosfer dan sterilisasi bahan menggunakan larutan dithane & agrept 2 gram/L dan NaClO 5,25%,
- b). Pembuatan media perlakuan dengan zat pengatur tumbuh BAP sebesar dan 2,4-D, masing-masing 3mg/L,
- c). Menyediakan pucuk daun *Camellia sinensis L*, pada daun posisi 1 sampai dengan 3 dengan luas 1 cm²
- d). Inisiasi eksplan dengan menanam potongan pucuk daun *Camellia sinensis L* pada media perlakuan,
- e). Induksi kalus dilanjutkan induksi suspensi *Camellia sinensis L* dilanjutkan dengan subkultur,
- f). Elisitasi kalus *Camellia sinensis L* dengan menggunakan ion logam Co sebanyak 4 ppm.
- g). Pemeriksaan pertumbuhan suspense dilanjutkan uji kualitatif - kuantitatif polifenon dengan HPLC,

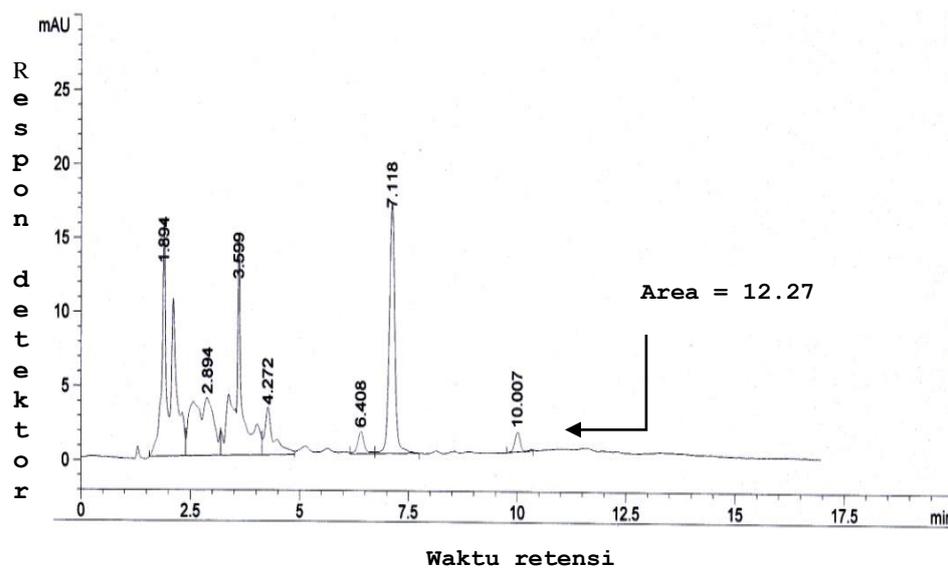
Dengan proses perwujudan invensi ini, dihasilkan produk polifenon dimana produk yang dihasilkan kadarnya sebesar 3.87 ppm.



Gambar 1.Indek Pertumbuhan Kultur suspense dengan ion logam Co



Gambar 2. Adalah Kromatogram senyawa standar polifenon dan luasan area dari kromatogram.



Gambar 3. Kromatogram senyawa sampel kultur suspense dan luasan area dari kromatogram sampel.